

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 24 日 (24.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/033024 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/445, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/10743

(22) 国際出願日: 2002 年 10 月 16 日 (16.10.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2001-318439  
2001 年 10 月 16 日 (16.10.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 良一 (SAITOH, Ryoichi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

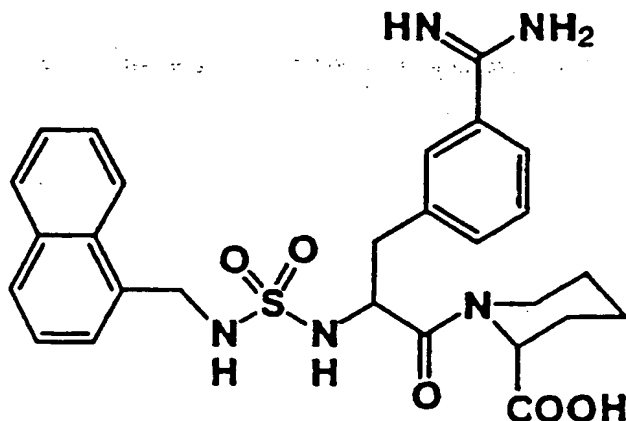
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL PROLIFERATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 細胞増殖抑制剤



(57) Abstract: It is found out that AT-264 represented by the following structural formula inhibits cell proliferation via a PepT1 activity inhibitory effect. By discussing whether or not AT-264 has a cell proliferation inhibitory effect on a human pancreatic cancer cell line AsPC-1, it is found out that AT-264 also inhibit the proliferation thereof. These findings indicate that the cell proliferation can be inhibited via the inhibition of the peptide transporter activity. It is expected that the inhibition of the peptide transporter activity would be usable as an important index in developing a proliferation inhibitor of cancer cells, etc.

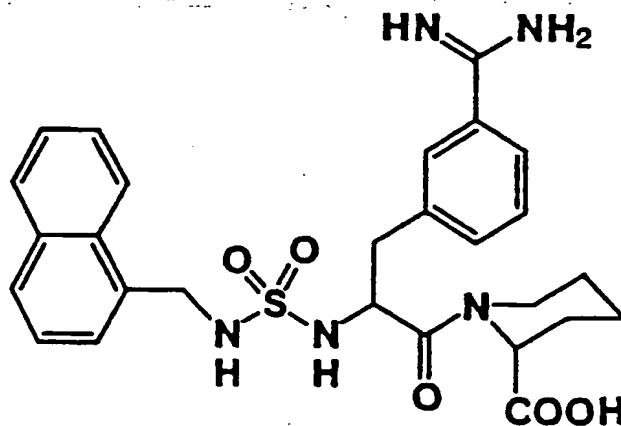
[続葉有]

WO 03/033024 A1



## (57) 要約:

下記の構造式で示されるAT-264が PepT1活性阻害作用を介して細胞増殖を抑制することを見出した。さらに、AT-264が、ヒト膵臓癌株As PC-1に対して細胞増殖抑制作用を有するか否かを検討した結果、同様に細胞増殖を抑制することを見出した。これらの知見は、ペプチドトランスポーターの活性を阻害することにより、細胞増殖を抑制しうゝことを示すものである。癌細胞などの増殖抑制剤の開発において、ペプチドトランスポーターの活性の抑制は重要な指標となると考えられる。



## 明細書

## 細胞増殖抑制剤

技術分野

本発明は、ペプチドトランスポーター阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤に関する。

背景技術

哺乳動物は、生体外から栄養源を取り込む必要性があり、細胞には多くの輸送タンパク質が存在することが知られている。ペプチドの輸送を行っているのはペプチドトランスポーター（ペプチド輸送タンパク質）であり、現在までに多数のペプチドトランスポーターが見出されている（J. Biol. Chem., 270(12);6456-6463, (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1235:461-466, (1995)、Mol. Microbiol., Vol. 16, p825, (1995)、特開平6-261761、特開平11-172、US5849525など）。ペプチドトランスポーターはペプチドの細胞内への流入を行うタンパク質と細胞外への流出を行うタンパク質に分けられる。又、輸送の際に利用するエネルギー源の違いによっても分類することができ、細胞内外のプロトンの濃度差を利用して輸送を行うプロトン駆動型ペプチドトランスポーターは、PTRファミリーに属する（Mol. Microbiol., Vol. 16, p825, (1995)）。一方生体内のATPを使用して輸送を行うペプチドトランスポーターはABCファミリーに属する（Annu. Rev. Cell. Biol., Vol 8, p67, (1992)）。

ペプチドトランスポーターはジペプチド、トリペプチドなどの小分子ペプチドだけでなく、 $\beta$ -ラクタム抗生物質、ACE阻害剤などの薬剤の輸送にも関与していることが報告されている（Ganapathy, Leibach., Curr. Biol. 3, 695-701, (1991)、Nakashima et al., Biochem. Pharm. 33, 3345-3352, (1984)、Friedman, A

midon., Pharm. Res., 6, 1043-1047, (1989)、Okano et al., J. Biol. Chem, 261, 14130-14134, (1986)、Muranushi et al., Pharm. Res., 6, 308-312, (1989)、Friedman, Amidon., J. Control. Rel., 13, 141-146, (1990))。

PepT1およびPepT2は小分子ペプチドを細胞内に取り込むことによりタンパク質の吸収やペプチド性窒素源の維持に寄与しているプロトン駆動型ペプチドトランスポーターであり、PepT1、PepT2はそれぞれアミノ酸708個、729個からなる12回膜貫通型タンパク質である (J. Biol. Chem., 270(12):6456-6463, (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1235:461-466, (1995)、Terada, Inui, Tanpakusitsu Kakusan Kouso., Vol. 46, No5, (2001))。

PepT1およびPepT2も $\beta$ -ラクタム抗生物質やベスタチンなどの薬物を輸送することが報告されている (Saito, H. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1631-1637, (1995)、Saito, H. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1280, 173-177, (1996)、Terada, T. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 281, 1415-1421 (1997))。

PepT1は主に小腸で発現し、腎臓、脾臓での発現も確認されている。PepT2は腎臓、脳、肺、脾臓での発現が確認されている。PepT1、PepT2は小腸や腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在していることが報告されている (Ogihara, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 220, 848-852, (1996)、Takahashi, K. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 286, 1037-1042 (1998)、Hong, S. et al., Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 276, F658-F665 (1999)、Terada, Inui, Tanpakusitsu Kakusan Kouso., Vol. 46, No5, (2001))。

また、ヒト膵管癌株でPepT1が細胞膜に過剰発現していること (Cancer Res., 58, 519-525, (1998)、およびPepT2のmRNAがヒト膵管癌株で発現していること (Millennium World Congress of Pharmaceutical Sciences, (2000)) が報告されている。しかしながら、PepT1およびPepT2の癌細胞増殖への関与は不明であり、PepT1およびPepT2の機能を阻害することにより癌細胞の増殖に影響を与えるか否

かの議論は行われていなかった。

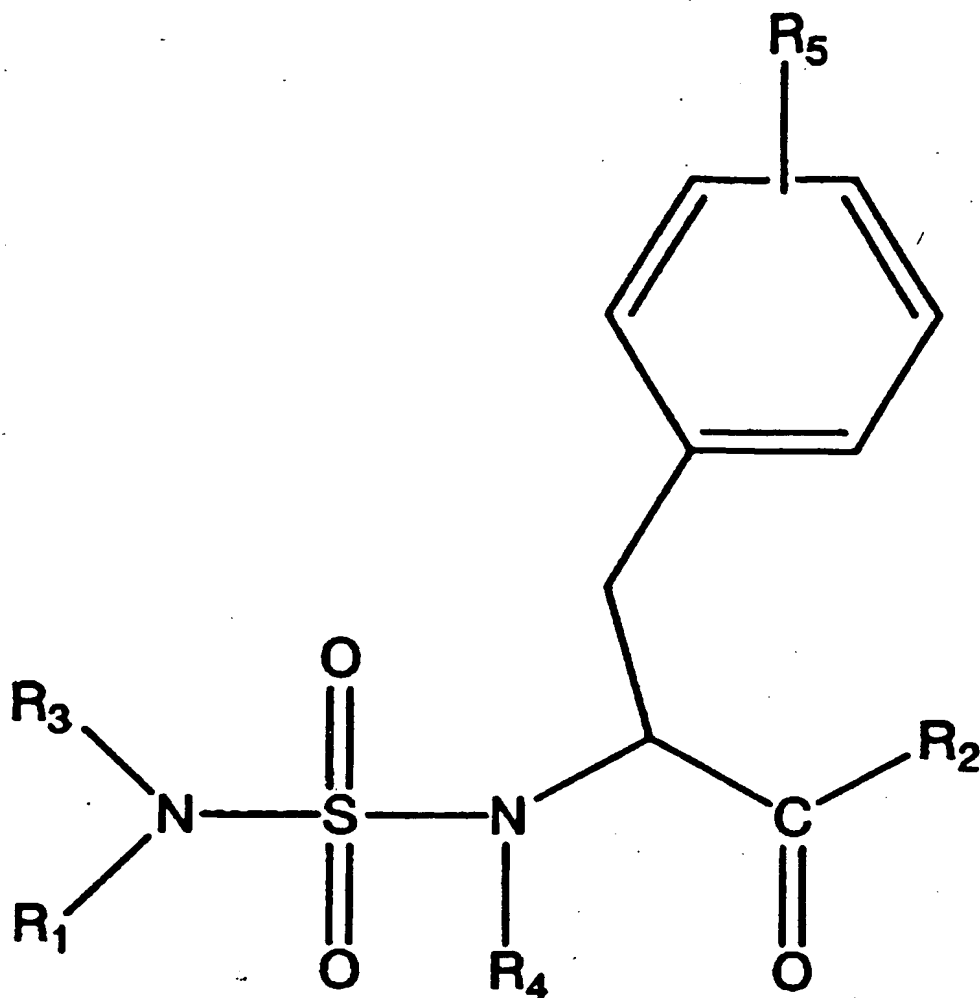
#### 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、ペプチドトランスポーター阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤、特に膵臓癌などの癌細胞増殖抑制剤を提供することにある。

本発明者らは、AT-264がPepT1活性阻害作用を介して細胞増殖を抑制することを見出した。さらに、AT-264が、ヒト膵臓癌株AsPC-1に対して細胞増殖抑制作用を有するか否かを検討した結果、同様に細胞増殖を抑制することを見出した。これらの知見は、ペプチドトランスポーターの活性を阻害することにより、細胞増殖を抑制しうることを示すものである。癌細胞などの増殖抑制剤の開発において、ペプチドトランスポーターの活性の抑制は重要な指標となると考えられる。

本発明は、より詳しくは、

- 〔1〕 ペプチドトランスポーター阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤、
  - 〔2〕 ペプチドトランスポーターがプロトン駆動型ペプチドトランスポーターである、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、
  - 〔3〕 ペプチドトランスポーターがPepT1またはPepT2である、〔1〕に記載の細胞増殖抑制剤、
  - 〔4〕 ペプチドトランスポーター阻害物質が、ペプチドトランスポーターに結合することによりペプチドトランスポーターの輸送機能を阻害する物質である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤、
  - 〔5〕 ペプチドトランスポーター阻害物質が下記一般式（1）で示されるスルファミド誘導体である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤、
- 一般式（1）



(式中、 $R_1$  は水素原子、低級アルキル基またはアミノ保護基を示し、 $R_2$  は置換基を有していてもよく、また縮合されていてもよい窒素原子含有の複素環を示し、 $R_3$  は基  $A-(CH_2)_m-$ 、水素原子または置換されていてもよい低級アルキル基を示す。ここで  $A$  は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環または置換されていてもよい低級シクロアルキル基を、 $m$  は 0～6 の整数を示す。また  $-(CH_2)_m-$  部分は 1 個以上の置換基で置換されていてもよい。 $R_4$  は水素原子、低級アルキル基またはアミノ保護基を示し、 $R_5$  は基  $-C(=NR_6)NH_2$ 、基  $-NH-C(=NR_6)NH_2$  または基  $-(CH_2)_n-NHR_6$  を、ここで  $R_6$  は水素原子、低級アルキル基、水酸基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニ

ル基、低級アルコキシカルボニルオキシ基または低級ヒドロキシアルキルカルボニルオキシ基を示し、 $n$ は0～2の整数を示す。また $-(CH_2)_n-$ の部分は1個以上の置換基で置換されていてもよい)

〔6〕癌細胞の増殖を抑制する、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤、

〔7〕癌細胞が膵臓癌細胞である、〔6〕に記載の細胞増殖抑制剤、  
を、提供するものである。

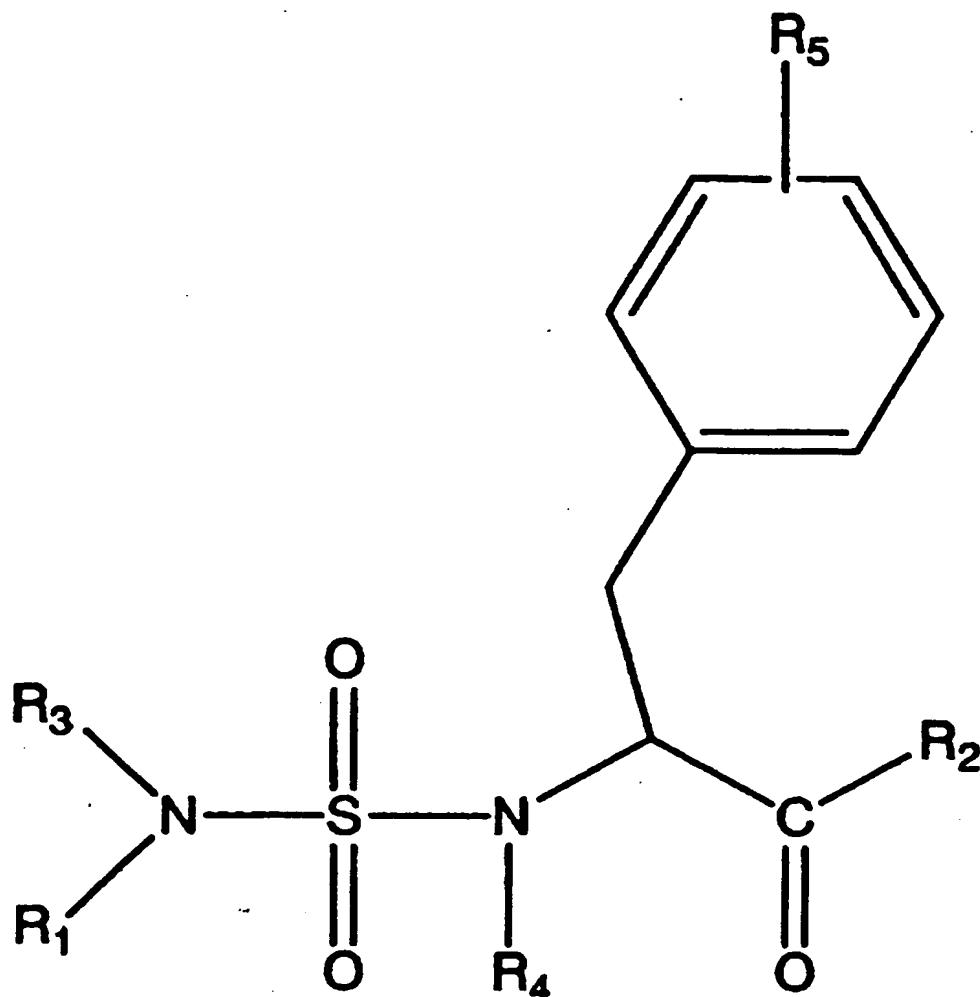
本発明は、ペプチドトランスポーター阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤を提供する。本発明の細胞増殖抑制剤の標的となるペプチドトランスポーターは特に限定されないが、好ましいのはプロトン駆動によりペプチドを細胞内に取り込むペプチドトランスポーターであり、さらに好ましいのはPepT1またはPepT2であり、特に好ましいのはPepT1である。

PepT1およびPepT2の塩基配列、アミノ酸配列は既に知られている（ヒトPepT1 : GenBank XM\_007063、J. Biol. Chem., 270(12);6456-6463, (1995)、ヒトPepT2 : GenBank XM\_002922、Biochim. Biophys. Acta., 1235;461-466, (1995)）。

本発明のペプチドトランスポーター阻害物質は、ペプチドトランスポーターを介した輸送を阻害し、細胞の増殖を抑制するものであれば、特に限定はされない。ペプチドトランスポーターを介した輸送を阻害する物質としては、例えば、ペプチドトランスポーターに結合してペプチドトランスポーターの輸送機能を阻害する物質、ペプチドトランスポーターの発現を抑制する物質などが挙げられるが、好ましいのはペプチドトランスポーターに結合してペプチドトランスポーターの輸送機能を阻害する物質である。

ペプチドトランスポーターに結合する物質としては、例えば、合成低分子化合物、抗体、蛋白質、ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、好ましくは下記一般式(1)で示される化合物(W097/19919参照)または抗体である。

## 一般式 (1)



(式中、 $R_1$  は水素原子、低級アルキル基またはアミノ保護基を示し、 $R_2$  は置換基を有していてもよく、また縮合されていてもよい窒素原子含有の複素環を示し、 $R_3$  は基  $A-(CH_2)_m-$ 、水素原子または置換されていてもよい低級アルキル基を示す。ここで  $A$  は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環または置換されていてもよい低級シクロアルキル基を、 $m$  は 0～6 の整数を示す。また  $-(CH_2)_m-$  部分は 1 個以上の置換基で置換されていてもよい。 $R_4$  は水素原子、低級アルキル基またはアミノ保護基を示し、 $R_5$  は基  $-C(=NR_6)NH_2$ 、基  $-NH-C(=NR_6)NH_2$  または基  $-(CH_2)_n-NHR_6$  を、ここで  $R_6$  は水素原子、低級アルキル基、水



酸基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルコキシカルボニルオキシ基または低級ヒドロキシアルキルカルボニルオキシ基を示し、 $n$ は0～2の整数を示す。また $-(CH_2)_n-$ の部分は1個以上の置換基で置換されていてもよい)で表されるスルファミド誘導体。

本発明において、特に限定がない場合は次の用語は以下の意味を示す。

低級アルキル基とは、炭素数1～6、好ましくは炭素数1～4の直鎖または分岐鎖状のアルキル基を意味し、例えばメチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、 $i$ -プロピル基、 $n$ -ブチル基、 $i$ -ブチル基、 $s$ -ブチル基、 $t$ -ブチル基等が挙げられる。

低級アルコキシ基とは、炭素数1～6、好ましくは炭素数1～4の直鎖または分岐鎖状のアルキルオキシ基を意味し、例えばメトキシ基、エトキシ基、 $n$ -プロポキシ基、 $i$ -プロポキシ基、 $n$ -ブトキシ基、 $i$ -ブトキシ基、 $s$ -ブトキシ基、 $t$ -ブトキシ基等が挙げられる。

アミノ保護基とは、一般式(1)の合成過程において、 $R1$ が結合するアミノ基を保護できる基であればよく、一般的に使用できるアミノ保護基が用いられる。このようなアミノ保護基としては、例えばホルミル基、アセチル基、ベンゾイル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、メトキシカルボニル基、 $t$ -ブトキシカルボニル基、フタロイル基、ベンジル基、トシル基等が挙げられ、好ましくは $t$ -ブトキシカルボニル基が挙げられる。

また、置換されていてもよいアミノ基とは、置換基として前述のアミノ保護基のほか、水酸基、置換されていてもよい低級アルキル基、置換されていてもよいアシル基、例えば置換されていてもよい低級アルコキシカルボニル基もしくは置換されていてもよい低級アルキルアミノカルボニル基、置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいスルホニル基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環基、置換されていてもよい低級アルコキシ基、置換されていてもよいシクロアルキル基、置換されていてもよいシクロアルキルオキシ

基、置換されていてもよいアリールオキシ基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環オキシ基、置換されていてもよいシリル基等が1個以上置換されていてもよいアミノ基を意味し、例えばメチルアミノ基、エチルアミノ基、アセチルアミノ基、ジメチルアミノカルボニルアミノ基、フェニルアミノ基、p-トルエンスルホニルアミノ基、メタンスルホニルアミノ基、4-ピペリジニルアミノ基、シクロヘキシルアミノ基、シクロペンチルアミノ基、シクロプロピルアミノ基などが挙げられ、好ましくはメチルアミノ基、エチルアミノ基、アセチルアミノ基、p-トルエンスルホニルアミノ基、メタンスルホニルアミノ基、シクロプロピルアミノ基等が挙げられる。

置換されていてもよい低級アルキル基とは、置換基として、ハロゲン原子、水酸基、チオール基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいアシル基、例えば置換されていてもよい低級アルコキシカルボニル基もしくは置換されていてもよい低級アルキルアミノカルボニル基、ニトロ基、シアノ基、置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいスルホニル基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環基、置換されていてもよいカルボキシ基、置換されていてもよい低級アルコキシ基、置換されていてもよいシクロアルキル基、置換されていてもよいシクロアルキルオキシ基、置換されていてもよいアリールオキシ基、置換されていてもよい低級アルキルチオ基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環オキシ基、置換されていてもよいシクロアルキルチオ基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環チオ基、置換されていてもよいアリールチオ基、置換されていてもよいスルホニルオキシ基、置換されていてもよいシリル基等が1個以上置換されていてもよい低級アルキル基を意味し、例えば、2-(ピロリジン-1-イルカルボニル)エチル基、3-フェニル-2-(ピロリジン-1-イルカルボニル)-n-プロピル基、3,3-ジフェニル-n-プロピル基、2,2-ジフェニルエチル基、2-シクロヘキシルオキシエチル基等が挙げられ、好ましくは3-フェニル-

2-（ピロリジン-1-イルカルボニル）-n-プロピル基、3, 3-ジフェニル-n-プロピル基、2, 2-ジフェニルエチル基等が挙げられる。

また置換されていてもよい低級アルコキシ基とは、置換基として前記の低級アルキル基で示したものと同様な基が置換された低級アルコキシ基を意味し、例えば、フルオロメトキシ基、フルオロエトキシ基、ベンジルオキシ基等が挙げられる。

アリール基とは芳香族炭化水素から水素原子1個を除いた基であり、例えば、フェニル基、トリル基、ナフチル基、キシリル基、ビフェニル基、アントリル基、フェナントリル基等が挙げられ、好ましくはフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

置換されていてもよいアリール基とは、前記のアリール基の任意の水素原子が1個以上の置換されていてもよい低級アルキル基、置換されていてもよい低級アルコキシ基、ハロゲン原子、水酸基、チオール基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいアシル基、置換されていてもよい低級アルキルチオ基、ニトロ基、シアノ基、置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアリールアルキル基、置換されていてもよいアリールオキシ基、置換されていてもよいスルホニル基、置換されていてもよいカルボキシ基、置換されていてもよい低級アルキルスルホニル基、置換されていてもよい低級アルキルスルホニルアミノ基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環基、置換されていてもよいシクロアルキルチオ基、置換されていてもよいスルホニルオキシ基、置換されていてもよいアリールチオ基、置換されていてもよいシリル基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環オキシ基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環チオ基等で置換されていてもよい基を意味し、例えばo-メチルフェニル基、m-ヒドロキシフェニル基、p-カルボキシフェニル基、2-フェネチルフェニル基、2, 3-ジメトキシフェニル基、2-メチル-4-アミノフェニル基、フェノキシフェニル基、3-フェネ

チルフェニル基、5-シアノナフチル基、4-アミノ-1-ナフチル基、6-ヒドロキシ-1-ナフチル基、3-メトキシフェニル基、2-メトキシフェニル基、2-エトキシフェニル基、2-ベンジルフェニル基、3-ブロモ-1-ナフチル基、6-メトキシ-1-ナフチル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等が挙げられ、好ましくは2-フェネチルフェニル基、6-ヒドロキシ-1-ナフチル基、3-ブロモ-1-ナフチル基、2, 3-ジメトキシフェニル基等が挙げられる。置換されていてもよいシクロアルキル基とは、炭素数3~7、好ましくは4~6のシクロアルキル基の任意の水素原子が、1個以上の置換基で置換されていてもよい基を示し、置換基の例としては、前記のアリール基と同様の基を示す。このような例としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、1-フルオロシクロプロピル基、2-ベンジルシクロヘキシル基、2-アミノシクロペンチル基、2-カルボキシシクロペンチル基、2-(6-メトキシ-1, 4-ベンゾキノン)等が挙げられ、好ましくはシクロヘキシル基等が挙げられる。

置換されていてもよく、また縮合されていてもよい窒素原子含有複素環とは、ヘテロ原子として1個以上の窒素原子を含有し、さらに酸素原子、イオウ原子等のヘテロ原子を含有していてもよい、3~7員環の飽和または不飽和の複素環を意味し、さらに3~7員環の他の芳香環、複素環、シクロアルキル環が1個以上縮合していてもよい。環上の炭素原子に結合する任意の水素原子は、1個以上の置換基で置換されていてもよく、このような置換基の例は、前述のアリール基の置換基と同様のものが挙げられる。窒素原子含有複素環の例としては、例えばアジリジン環、アゼチジン環、ピロール環、ピロリン環、ピロリジン環、インドール環、インドリン環、イソインドール環、オクタヒドロインドール環、カルバゾール環、ピリジン環、ピペリジン環、キノリン環、ジヒドロキノリン環、テトラヒドロキノリン環、デカヒドロキノリン環、イソキノリン環、テトラヒドロイソキノリン環、デカヒドロイソキノリン環、キノロン環、アクリジン環、フェナン

トリジン環、ベンゾキノリン環、ピラゾール環、イミダゾール環、イミダゾリン環、イミダゾリジン環、ベンゾイミダゾール環、ピリダジン環、ピリミジン環、ピラジン環、ピペラジン環、ベンゾジアジン環、トリアゾール環、ベンソトリアゾール環、トリアジン環、テトラゾール環、テトラジン環、プリン環、キサンチン環、テオフィリン環、グアニン環、プテリジン環、ナフチリジン環、キノリジン環、キヌクリジン環、インドリジン環、オキサゾール環、ベンゾオキサゾール環、イソオキサゾール環、オキサジン環、フェノキサジン環、チアゾール環、チアゾリジン環、ベンゾチアゾール環、イソチアゾール環、チアジン環、オキサジアゾール環、オキサジアジン環、チアジアゾール環、チアジアジン環、ジチアジン環、モルホリン環等が挙げられ、このうち、ピペリジン環、ピペラジン環、イソキノリン環、テトラヒドロイソキノリン環等が好ましい。置換基を有するものとしては、例えばN-アセチルピペラジン環、N-p-トルエンスルホニルピペラジン環、4-メチルピペリジン環等が好ましい例として挙げられる。

また、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環とは、ヘテロ原子として1個以上の窒素原子、酸素原子またはイオウ原子を含有している3～7員環の飽和または不飽和の複素環を意味し、さらに3～7員環の他の芳香環、複素環、シクロアルキル環が1個以上縮合していてもよい。環上の炭素原子に結合する任意の水素原子は、1個以上の置換基で置換されていてもよく、このような置換基の例は、前述のアリール基の置換基と同様のものが挙げられる。このような複素環の例としては、前述の窒素原子含有複素環のほかに、例えばピラン環、フラン環、テトラヒドロピラン環、テトラヒドロフラン環、チオフエン環、ベンゾチオフエン環、ジヒドロベンゾチオフエン環、ベンゾフラン環、イソベンゾフラン環、クロマン環、クロメン環、ジベンゾフラン環、イソクロマン環、フェノキサチン環、キサンチン環、チアンスレン環、ベンゾジオキササン環、ベンゾジオキサラン環、チオラン環等が挙げられ、好ましくはベンゾチオフエン環が挙げられる。

アシル基とは、カルボン酸のカルボキシル基のOHを除いた基であり、例えばホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、オキサリル基、マロニル基、スクシニル基、ベンゾイル基、トルオリル基、ナフトイル基、フタロイル基、ピロリジンカルボニル基、ピリジンカルボニル基等が挙げられ、好ましくはアセチル基、ベンゾイル基等が挙げられる。また、置換されていてよいアシル基とは、置換基として低級アルキル基、その他前記低級アルキル基で示したものと同様な基で置換されたアシル基を意味し、例えば、置換されていてもよい低級アルキルカルボニル基、置換されていてもよい低級アルキルアミノカルボニル基、置換されていてもよい低級アルキルオキシカルボニル基、アミノカルボニルカルボニル基等が挙げられる。

アシルオキシ基とは、アシル基に酸素原子が結合した基を意味し、例えばアセトキシ基、ベンゾイルオキシ基等が挙げられる。

低級アルコキシカルボニル基とは、低級アルコキシ基にカルボニル基が結合した基を意味し、アルコキシ部分の炭素数が1～6、好ましくは1～4の基を示す。例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、n-プロポキシカルボニル基、i-プロポキシカルボニル基、n-ブトキシカルボニル基、i-ブトキシカルボニル基、s-ブトキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基等が挙げられ、好ましくはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等が挙げられる。

低級アルコキシカルボニルオキシ基とは、低級アルコキシカルボニル基に酸素原子が結合した基で、アルコキシ部分の炭素数が1～6、好ましくは1～4の基を示す。例えば、メトキシカルボニルオキシ基、エトキシカルボニルオキシ基、n-プロポキシカルボニルオキシ基、i-プロポキシカルボニルオキシ基、n-ブトキシカルボニルオキシ基、i-ブトキシカルボニルオキシ基、s-ブトキシカルボニルオキシ基、t-ブトキシカルボニルオキシ基等が挙げられ、好ましくはメトキシカルボニルオキシ基、エトキシカルボニルオキシ基等が挙げられる。

ヒドロキシアルキルカルボニルオキシ基とは、前記の低級アルキル基に1個以上の水酸基が置換した基にカルボニルオキシ基(COO)が結合した基を示し、例えばヒドロキシメチルカルボニルオキシ基、2-ヒドロキシエチルカルボニルオキシ基、2,3-ジヒドロキシプロピルカルボニルオキシ基等のアルキル部分の炭素数が1~6、好ましくは1~4の基が挙げられる。

ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

低級アルキルスルホニル基とは、前記の低級アルキル基にスルホニル基が結合した基で、炭素数1~6、好ましくは1~4のものが挙げられ、例えばメチルスルホニル基、エチルスルホニル基、n-プロピルスルホニル基、i-プロピルスルホニル基等が挙げられる。

またアリールスルホニル基とは、前記のアリール基にスルホニル基が結合した基を意味し、例えばフェニルスルホニル基、ナフチルスルホニル基等が好ましい例として挙げられる。

置換されていてもよい低級アルキルスルホニル基および置換されていてもよいアリールスルホニル基は、前記低級アルキルスルホニル基及びアリールスルホニル基の炭素原子に結合する任意の水素原子が1個以上の置換基で置換されていてもよい基を示し、置換基の例としては前記アリール基の置換基として記載したものと同様のものが挙げられる。このような例としては、例えば、p-トルエンスルホニル基、トリフルオロメタンスルホニル基等が挙げられる。

置換されていてもよいアミノスルホニル基とは、前記の置換されていてもよいアミノ基にスルホニル基が結合した基で、例えばメチルアミノスルホニル、ベンジルアミノスルホニル基等が挙げられる。

置換されていてもよい低級アルコキシスルホニル基とは、前記の置換されていてもよい低級アルコキシ基にスルホニル基が結合した基を意味し、例えばメトキシスルホニル基、ベンジロキシスルホニル基等が好ましい例として挙げられる。

。置換されていてもよいシクロアルキルオキシスルホニル基とは、置換されていてもよいシクロアルキル基に、酸素原子を介して、スルホニル基が結合した基を意味し、例えばシクロヘキシルオキシスルホニル基、シクロペンチルオキシスルホニル基等が挙げられる。

置換されていてもよいシクロアルキルスルホニル基とは、前記の置換されていてもよいシクロアルキル基にスルホニル基が結合した基で、例えばシクロヘキシルスルホニル基、シクロペンチルスルホニル基等が挙げられる。

置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環スルホニル基とは、置換されていてもよい複素環基にスルホニル基が結合した基を意味し、例えば4-キノリルスルホニル基、8-テトラヒドロキノリルスルホニル基等が好ましい例として挙げられる。

さらに、置換されていてもよいスルホニル基とは、置換されていてもよい低級アルキルスルホニル基、置換されていてもよいシクロアルキルスルホニル基、置換されていてもよいシクロアルキルオキシスルホニル基、置換されていてもよいアミノスルホニル基、置換されていてもよく、縮合されていてもよい複素環スルホニル基、置換されていてもよい低級アルコキシスルホニル基あるいは置換されていてもよいアリールスルホニル基を示す。

置換されていてもよいカルボキシル基とは、前記の置換されていてもよいアシル基にオキシ基が結合した基を意味し、例えばメチルカルボニルオキシ基、エチルカルボニルオキシ基、イソプロピルカルボニルオキシ基、フェニルカルボニルオキシ基、シクロヘキシルカルボニルオキシ基等が挙げられる。

低級アルコキシアルキル基とは、前記の低級アルコキシ基に低級アルキル基が結合した基を意味し、例えばメトキシメチル基、メトキシエチル基、*t*-ブトキシメチル基、1-エトキシエチル基、1-(イソプロポキシ)エチル基等が挙げられる。また低級アルコキシアルキル基のアルコキシ基またはアルキル基の部分は、前記のアルキル基で示した置換基と同様な基で置換されていてもよい。



低級ヒドロキシアルキル基とは、前記の低級アルキル基に1個以上の水酸基が置換された基を意味し、例えばヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、1-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシ-n-プロピル基、2, 3-ジヒドロキシ-n-ブチル基等が挙げられる。また、低級ヒドロキシアルキル基のアルキル基の部分は、前記アルキル基で示した置換基と同様な基で置換されていてもよい。

低級アミノアルキル基とは、前記の置換されていてもよいアミノ基に前記低級アルキル基が結合した基を意味し、例えばt-ブチルアミノメチル基、アミノメチル基、2-アミノエチル基、ベンジルアミノメチル基、メチルアミノメチル基、2-メチルアミノエチル基等が挙げられる。また、低級アミノアルキル基のアルキル基の部分は、前記アルキル基で示した置換基と同様な基で置換されていてもよい。

低級カルボキシアルキル基とは、前記の置換されていてもよいカルボキシル基に前記の低級アルキル基が結合した基で、例えばアセチルオキシメチル基、2-アセチルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、シクロヘキシルカルボニルオキシメチル基、シクロプロピルカルボニルオキシメチル基、イソプロピルカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。また低級カルボキシアルキル基のアルキル基の部分は、前記アルキル基で示した置換基と同様な基で置換されていてもよい。

低級カルボニルアミノアルキル基とは、前記の置換されていてもよいアシル基に前記低級アミノアルキル基が結合した基を意味し、例えばアセチルアミノメチル基、t-ブチルオキシカルボニルアミノメチル基、エチルカルボニルアミノメチル基、アセチルアミノエチル基、ベンジルオキシカルボニルアミノエチル基等が挙げられる。また、低級カルボニルアミノアルキル基のアミノ基またはアルキル基の部分は、前記アルキル基で示した置換基と同様な基で置換されていてもよい。

置換されていてもよい低級アルキルチオ基とは、前記の置換されていてもよい低級アルキル基にチオ基が結合した基で、例えばメチルチオ基、エチルチオ基、イソプロピルチオ基、*t*-ブチルチオ基等が挙げられる。

置換されていてもよいシクロアルキルチオ基とは、前記の置換されていてもよいシクロアルキル基にチオ基が結合した基を意味し、例えばシクロプロピルチオ基、シクロブチルチオ基、シクロペンチルチオ基、シクロヘキシルチオ基等が挙げられる。

置換されていてもよいアリールチオ基とは、前記の置換されていてもよいアリール基にチオ基が結合した基で、例えばフェニルチオ基、1-ナフチルチオ基、2-ナフチルチオ基等が挙げられる。

置換されていてもよく、縮合されていてもよい複素環チオ基とは、前記の置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環基にチオ基が結合した基を意味し、例えば4-キノリルチオ基、8-テトラヒドロキノリルチオ基等が挙げられる。

置換されていてもよいスルホニルオキシ基とは、前記の置換されていてもよいスルホニル基にオキシ基が結合した基で、例えば

-トルエンスルホニルオキシ基、メタンスルホニルオキシ基等が挙げられる。

置換されていてもよいシクロアルキルオキシ基とは、前記の置換されていてもよいシクロアルキル基にオキシ基が結合した基で、例えばシクロプロピルオキシ基、シクロペンチルオキシ基、4-アミノシクロヘキシルオキシ基等が挙げられる。

置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環オキシ基とは、前記の置換されていてもよく、縮合されていてもよい複素環基にオキシ基が結合した基を意味し、例えば4-キノリルオキシ基、8-テトラヒドロキノリルオキシ基等が挙げられる。

置換されていてもよいシリル基とは、前記の置換されていてもよい低級アルキ

ル基または置換されていてもよいアリール基が、同一または異なる1～3個結合したシリル基を示し、例えばトリメチルシリル基、トリエチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基、トリイソプロピルシリル基等が挙げられる。

また $-(CH_2)_m-$ 部分および $-(CH_2)_n-$ 部分で置換されていてもよい置換基としては、前記アリール基の置換基として記載したものと同様のものが挙げられる。

本発明の細胞増殖抑制剤の有効成分として使用される抗体は、抗原と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（W098/46777など）等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルスティンらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組

換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生さ

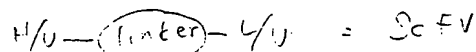
せることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby

hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

また、抗体はPepTに結合し、PepTの機能を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってもよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンなどで処理し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 171, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)。scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカ



ーとしては、例えば12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

前記のように発現、産生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されている公知の方法により精製することができる。例えば、プロテインAカラムなどのアフィニティークラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる（Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。

抗体の抗原結合活性（Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

特定の分子がペプチドトランスポーターに結合するか否かは、公知の方法により測定することができる。公知の方法としては、例えば、免疫沈降法、ウエストウエスタンブロッティング法、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）、蛍光免疫法、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを用いた方法、などが挙げられる。

このようなペプチドトランスポーターへの結合活性を指標に、本発明の細胞増殖抑制剤の候補化合物をスクリーニングすることが可能である。具体的には、ペプチドトランスポーターに被検試料を接触させ、ペプチドトランスポーターと被検試料との結合を検出し、ペプチドトランスポーターに結合する化合物を選択すればよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製蛋白質（抗体を含む）、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。ペプチドトランスポーターは、例えば、精製した蛋白質として、担体に結合させた形態として、他の蛋白質との融合蛋白質として、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被検試料に接触させることができる。このようにして得られたペプチドトランスポーターに結合する化合物から、本発明の細胞増殖抑制剤の有力な候補を選択するために、これら化合物がペプチドトランスポーターの輸送機能を阻害するか否かを検出することが有用である。特定の分子がペプチドトランスポーターの輸送機能を阻害しているか否かは、公知の方法、例えば、放射性物質（ $^{14}\text{C}$ など）、蛍光物質などでペプチドなどの基質を標識し、該基質がペプチドトランスポーター発現細胞に取り込まれた量を測定すること等により判断することができる。

本発明の細胞増殖抑制剤の有効成分としては、ペプチドトランスポーターの発現を抑制する物質を使用することもできる。このような物質としては、例えば、ペプチドトランスポーター遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、ペプチドト



## 23

ランスポーターをコードするDNAまたはmRNAのいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくはペプチドランスポーターのDNAまたはmRNA中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができ、例えば、メチルホスホネート型やエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

本発明の細胞増殖抑制剤の標的となる細胞としては特に限定はされないが、好ましいのは膵臓癌、肝臓癌、肺癌、食道癌、乳癌、大腸癌などの癌細胞であり、特に好ましいのは膵臓癌細胞である。本発明の細胞増殖抑制剤は、細胞増殖に起因する疾患、特に膵臓癌などの癌の治療、予防を目的として使用される。

本発明の細胞増殖抑制剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の治療薬はこれらの投与量に制限されるものではない。また、発明の治療薬は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

### 図面の簡単な説明

図1は、Caco-2細胞におけるAT-264のPepT1阻害能を示す図である。

図2は、AT-264のヒト膵臓癌株AsPC-1に対する細胞増殖抑制効果を示す図である。データは平均±S.D. (n=3-4) で表示した。

図3は、BaF3/PepT2におけるAT-264のPepT2阻害能を示す図である。データは平均±S.D. (n=3-4) で表示した。

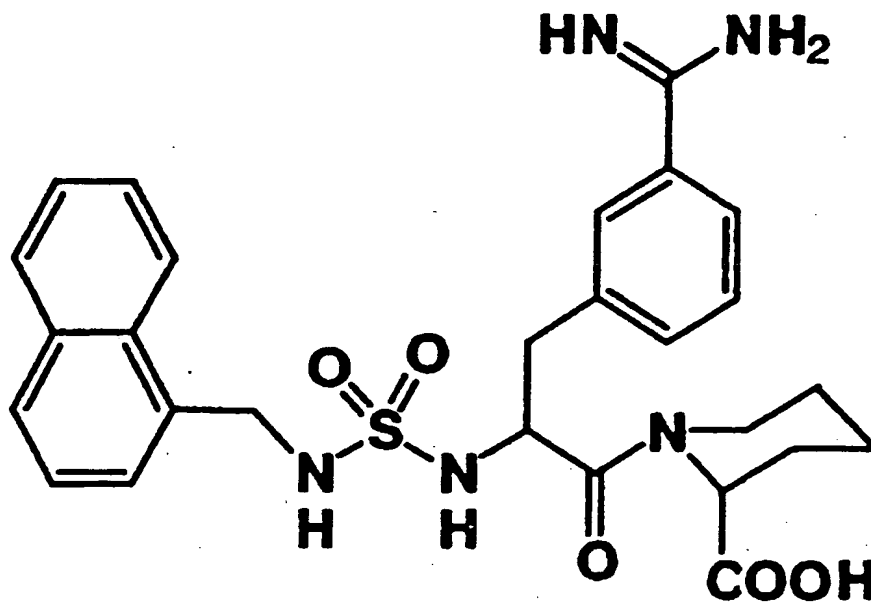
図4は、AT-264のヒト膵臓癌株BxPC-3に対する細胞増殖抑制効果を示す図である。データは平均±S.D. (n=6) で表示した。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### 【実施例1】 AT-264のPepT1活性阻害作用

AT-264は下記構造式で示される構造を有している。本化合物がペプチドトランスポーター (PepT) の阻害剤であることを以下の実験により確認した。



AT-264のPepT阻害能力をヒト結腸癌細胞株（Caco-2細胞）で検討した。その結果、放射性基質 $[^{14}\text{C}]$ グリシルサルコシンの細胞内への取込みに対する $\text{IC}_{50}$ は $100\text{ }\mu\text{M}$ であった（図1）。Caco-2細胞ではPepT1のみが発現しており、AT-264はPepT1の機能を阻害したと考えられた。なお、本実験で使用したAT-264は純度が約50～60%であり、実際の $\text{IC}_{50}$ は $50\text{ }\mu\text{M}$ 程度であると考えている。

〔実施例2〕 AT-264のヒト膵臓癌株AsPC-1に対する細胞増殖抑制作用

AT-264をRPMI1640-10mM Hepes（以下、培地と略す）、0.5% エタノール、0.5% DMSOで溶解し、 $2.5\text{mM}$  AT-264溶液を調製した。また、この溶液を培地で希釈して $0.625$ ならびに $0.0625\text{mM}$  AT-264溶液を調製した。

ヒト膵臓癌株AsPC-1を50%FBSを含む培地で $5\times 10^4$ 細胞/mLに調製した。この懸濁液を $40\text{ }\mu\text{L/well}$ （ $2\times 10^3$ 細胞）でCollagen type Iコート済みの96wellプレートに蒔き、 $160\text{ }\mu\text{L}$ のAT-264溶液を添加した。 $\text{CO}_2$ インキュベーターで6日間培養し（培養2日後に $100\text{units/mL}$ ペニシリン、 $0.1\text{mg/mL}$ ストレプトマイシンを添加）、培養6日後に、生細胞数をMTS assayで定量化した。

図2に細胞増殖試験結果を示した。 $2\text{mM}$  AT-264存在下で約30%、 $0.5\text{mM}$ でも若干ではあるが細胞増殖抑制が認められた。顕微鏡下での観察において、AsPC-1の形態変化はAT-264存在下でも見られなかった。また、RT-PCRの結果から、AsPC-1ではPepT1が発現がPepT2に比べて優勢であった。以上より、AT-264による細胞増殖抑制は、非特異的細胞毒性ではなくPepT1の機能阻害によると考えられた。

〔実施例3〕 AT-264のPepT2活性阻害作用

マウス骨髄由来細胞株BaF3にヒトPepT2を強制発現させた細胞（以下、BaF3/PepT2と略す）を用いて、AT-264のPepT2阻害能力を検討した。その結果、放射性基質 $[^3\text{H}]$ グリシルサルコシンの細胞内への取り込みは濃度依存的に阻害された（図3）。以上より、AT-264はPepT1のみならず、PepT2の機能を阻害することが明らかとなった。

〔実施例4〕 AT-264のヒト膵臓癌株BxPC-3に対する細胞増殖抑制作用

AT-264をRPMI1640-10mM Hepes, 100units/mLペニシリン, 0.1mg/mLストレプトマイシン (以下、培地と略す)、0.5% エタノール、0.5% DMSOで溶解し、2.5mM AT-264溶液を調製した。また、この溶液を培地で希釈して0.625ならびに0.0625mM AT-264溶液を調製した。

BxPC-3を50%FBSを含む培地で $5 \times 10^4$ 細胞/mLに調製した。この懸濁液を40  $\mu$ L/well ( $2 \times 10^3$ 細胞) でCollagen type I コート済みの96wellプレートに蒔き、160  $\mu$ LのAT-264溶液を添加した。 $\text{CO}_2$ インキュベーターで6日間培養し、培養6日後に生細胞数をMTS assayで定量化した。

図4に細胞増殖試験結果を示した。2mM AT-264存在下で約75%、0.5mMでも約20%の細胞増殖抑制が認められた。顕微鏡下での観察において、BxPC-3の形態変化はAT-264存在下でも見られなかった。また、RT-PCRの結果から、BxPC-3ではPepT2の発現がPepT1に比べて優勢であった。以上より、AT-264による細胞増殖抑制は、細胞毒性ではなくPepT2の機能阻害によると考えられた。

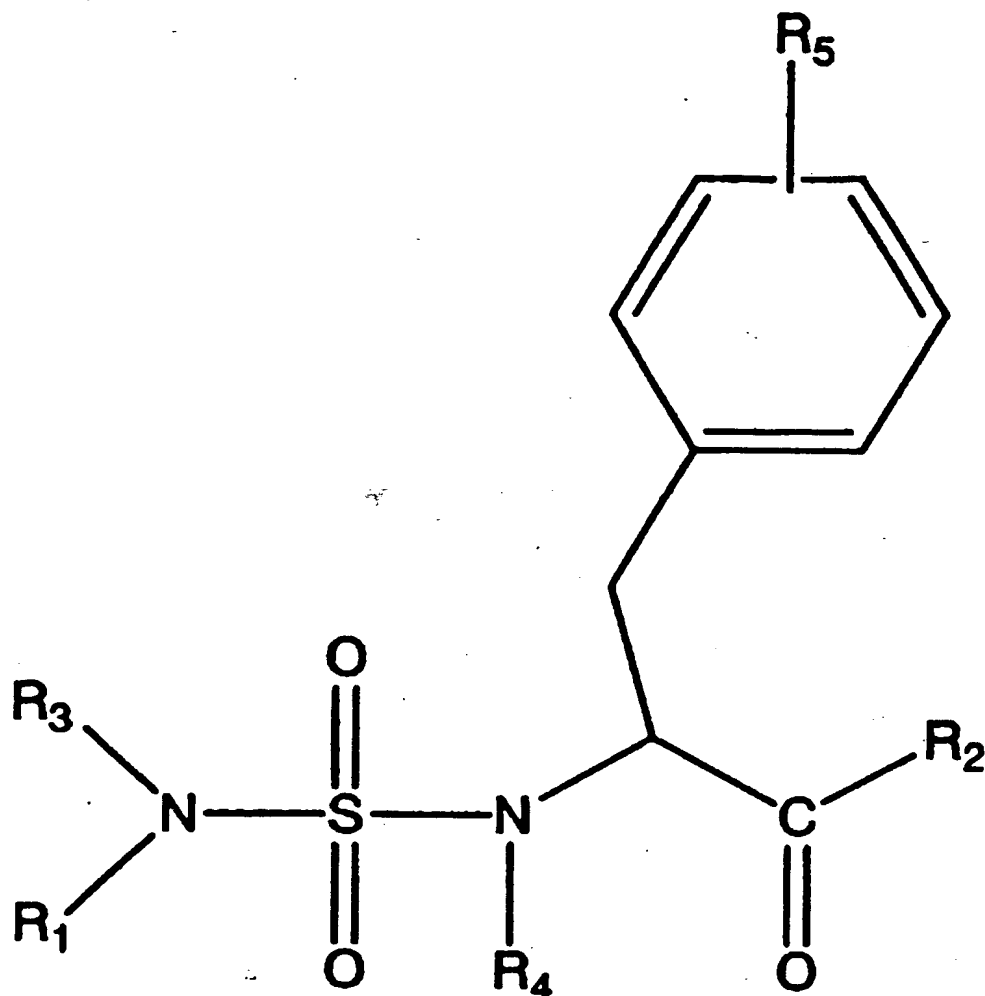
#### 産業上の利用の可能性

本発明により、ペプチドトランスポーターの活性を阻害することにより、細胞増殖を抑制することが可能であることが見出された。これによりペプチドトランスポーターを標的として、細胞増殖抑制剤を開発することが可能となった。このような細胞増殖抑制剤は、癌 (例えば、膵臓癌等) の増殖の抑制に利用されることが大いに期待される。

## 請求の範囲

1. ペプチドトランスポーター阻害物質を有効成分とする細胞増殖抑制剤。
2. ペプチドトランスポーターがプロトン駆動型ペプチドトランスポーターである、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
3. ペプチドトランスポーターがPepT1またはPepT2である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
4. ペプチドトランスポーター阻害物質が、ペプチドトランスポーターに結合することによりペプチドトランスポーターの輸送機能を阻害する物質である、請求項1～3のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。
5. ペプチドトランスポーター阻害物質が下記一般式（1）で示されるスルファミド誘導体である、請求項1～3のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

一般式（1）



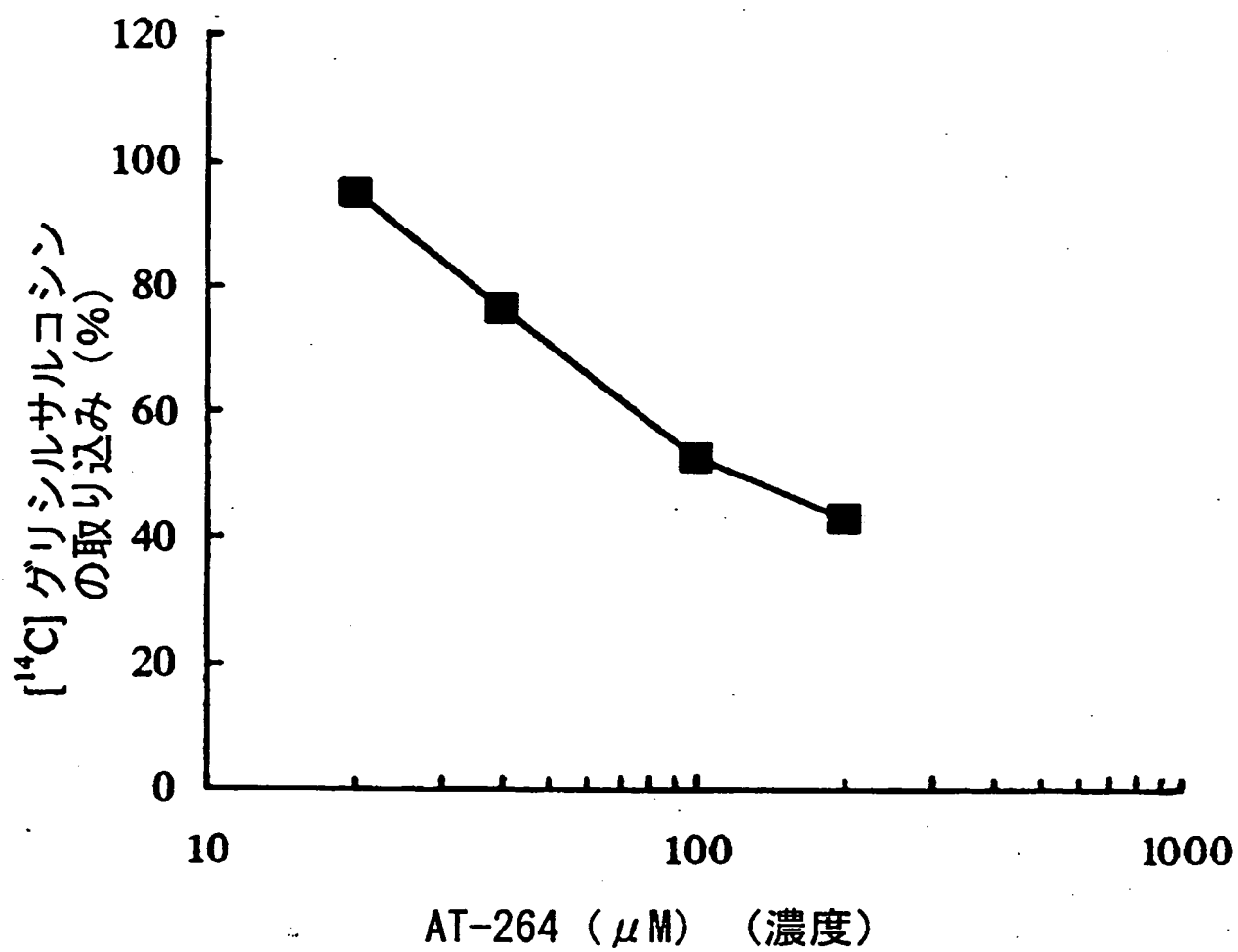
(式中、 $R_1$  は水素原子、低級アルキル基またはアミノ保護基を示し、 $R_2$  は置換基を有していてもよく、また縮合されていてもよい窒素原子含有の複素環を示し、 $R_3$  は基  $A-(CH_2)_m-$ 、水素原子または置換されていてもよい低級アルキル基を示す。ここで  $A$  は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよく、また縮合されていてもよい複素環または置換されていてもよい低級シクロアルキル基を、 $m$  は 0～6 の整数を示す。また  $-(CH_2)_m-$  部分は 1 個以上の置換基で置換されていてもよい。 $R_4$  は水素原子、低級アルキル基またはアミノ保護基を示し、 $R_5$  は基  $-C(=NR_6)NH_2$ 、基  $-NH-C(=NR_6)NH_2$  または基  $-(CH_2)_n-NHR_6$  を、ここで  $R_6$  は水素原子、低級アルキル基、水酸基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニ

ル基、低級アルコキシカルボニルオキシ基または低級ヒドロキシアルキルカルボニルオキシ基を示し、 $n$ は0～2の整数を示す。また $-(CH_2)_n-$ の部分は1個以上の置換基で置換されていてもよい)

6. 癌細胞の増殖を抑制する、請求項1～5のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。
7. 癌細胞が膵臓癌細胞である、請求項6に記載の細胞増殖抑制剤。

1 / 4

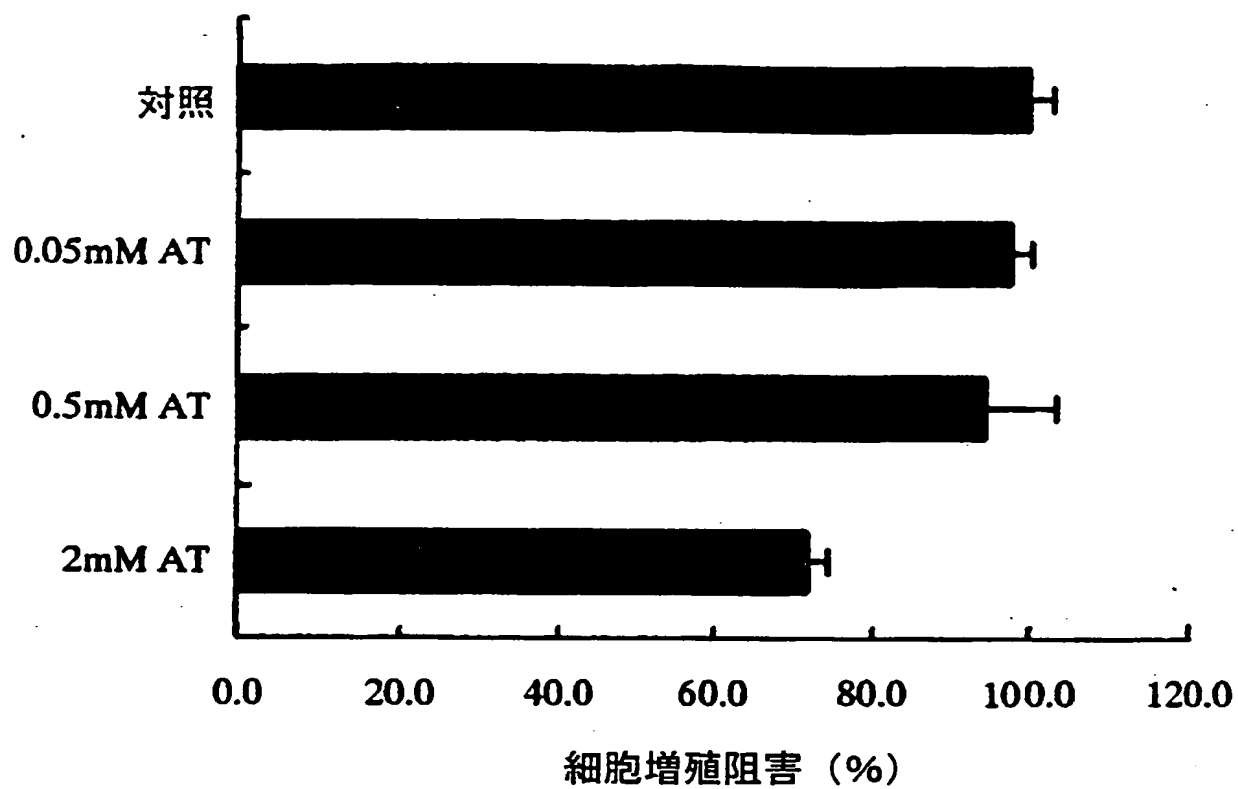
図 1





2 / 4

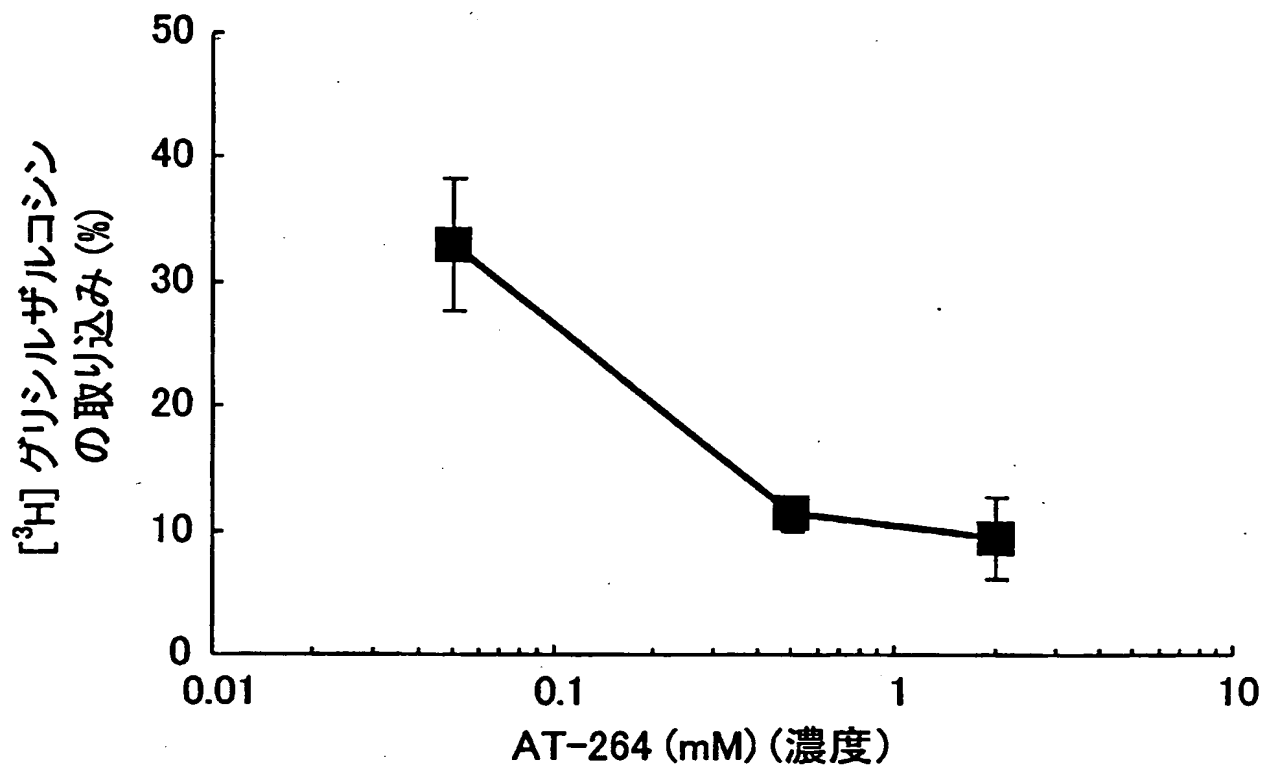
図 2



BEST AVAILABLE COPY

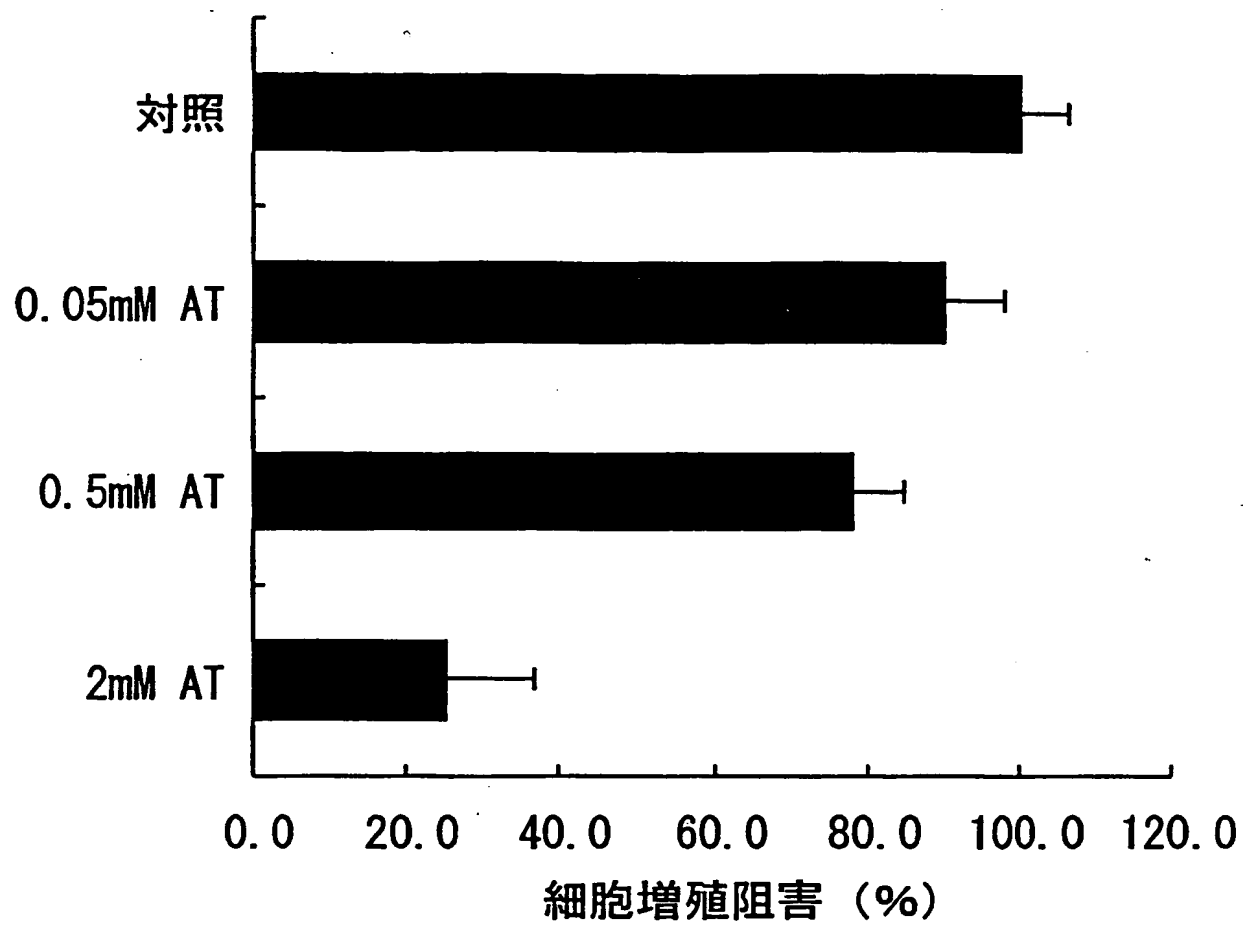
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10743

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/445, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/445, 45/00-45/08, A61P35/00-35/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN),  
REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | KNUETTER, Ilka et al., A Novel Inhibitor of the Mammalian Peptide Transporter PEPT1, Biochemistry, 10 April, 2001 (10.04.01), Vol.40, No.14, pages 4454 to 4458                                     | 1-7                   |
| A         | MRSNY, Randall J., Oligopeptide Transporters as Putative Therapeutic Targets for Cancer Cells, Pharmaceutical Research, June, 1998, Vol.15, No.6, pages 816 to 818                                  | 1-7                   |
| A         | NAKANISHI, Takeo et al., Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity, International Journal of Cancer, 15 October, 2000 (15.10.00), Vol.88, No.2, pages 274 to 280 | 1-7                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 January, 2003 (21.01.03)Date of mailing of the international search report  
04 February, 2003 (04.02.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10743

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | GONZALEZ, Deborah E. et al., An Oligopeptide Transporter Is Expressed at High Levels in the Pancreatic Carcinoma Cell Lines AsPc-1 and Capan 2, Cancer Research, 01 February, 1998 (01.02.98), Vol.58, No.3, pages 519 to 525    | 1-7                   |
| A         | WO 97/19919 A1 (C&C RESEARCH LABORATORIES), 05 June, 1997 (05.06.97),<br>& AU 9676557 A & KR 99071666 A  | 5-7                   |
| A         | SUGANO, Kiyohiko et al., Quantitative Structure-Intestinal Permeability Relationship of Benzamidine Analogue Thrombin Inhibitor, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, September, 2000, Vol.10, Issue 17, pages 1939 to 1942 | 5-7                   |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A 6 1 K 4 5 / 0 0, 3 1 / 4 4 5, A 6 1 P 3 5 / 0 0

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A 6 1 K 3 1 / 4 4 5, 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8, A 6 1 P 3 5 / 0 0 - 3 5 / 0 4

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN) EMBASE (STN) BIOSIS (STN) CAPLUS (STN)  
REGISTRY (STN) WPI (DIALOG) JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | KNUETTER, Ilka et al., A Novel Inhibitor of the Mammalian Peptide Transporter PEPT1,<br>Biochemistry, April 10, 2001, Volume 40, Number 14,<br>pages 4454-4458               | 1 - 7            |
| A               | MRSNY, Randall J., Oligopeptide Transporters as Putative Therapeutic Targets for Cancer Cells,<br>Pharmaceutical Research, June, 1998, Volume 15, Number 6,<br>pages 816-818 | 1 - 7            |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 1 . 0 3

国際調査報告の発送日

04.02.03.

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内 田 俊 生



4 C 8 2 1 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

## C (続き) 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | NAKANISHI, Takeo et al., Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity,<br>International Journal of Cancer, October 15, 2000,<br>Volume 88, Number 2, pages 274-280                                     | 1 - 7            |
| A               | GONZALEZ, Deborah E. et al., An Oligopeptide Transporter Is Expressed at High Levels in the Pancreatic Carcinoma Cell Lines AsPc-1 and Capan 2,<br>Cancer Research, February 1, 1998, Volume 58, Number 3,<br>pages 519-525            | 1 - 7            |
| A               | WO 97/19919 A1 (C&C RESEARCH LABORATORIES) 1997.06.05<br>& AU 9676557 A & KR 99071666 A  | 5 - 7            |
| A               | SUGANO, Kiyohiko et al., Quantitative Structure-Intestinal Permeability Relationship of Benzamidine Analogue Thrombin Inhibitor,<br>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, September, 2000,<br>Volume 10, Issue 17, pages 1939-1942 | 5 - 7            |

DESCRIPTION  
CELL GROWTH INHIBITORS

Technical Field

5       The present invention relates to cell growth inhibitors comprising a peptide transporter inhibitory substance as an active ingredient.

Background Art

10       Mammalian animals need to take in external sources of nutrition, and many transport proteins are known to exist in cells. Many peptide transporters (peptide transport proteins), which carry out peptide transport, have been found to date (for example, J. Biol. Chem., 270(12):6456-6463, (1995); Biochim. Biophys. Acta., 1235:461-466, (1995); Mol. Microbiol., Vol. 16, p825, (1995);  
15       Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Hei 6-261761; JP-A Hei 11-172; and US 5849525). Peptide transporters can be classified into proteins that import peptides into cells, and proteins that export peptides from cells. They can also be classified  
20       according to the different energy sources used during transport. Proton-driven peptide transporters, which carry out transport by utilizing the difference between proton concentration inside and outside of a cell, belong to the PTR family (Mol. Microbiol., Vol. 16, p825, (1995)). Peptide transporters that carry out transport  
25       using ATP in the body belong to the ABC family (Annu. Rev. Cell. Biol., Vol. 8, p67, (1992)).

      There are reports that peptide transporters are involved in the transport of not only small-molecule peptides such as dipeptides and tripeptides, but also of pharmaceutical agents such as  $\beta$ -lactam  
30       antibiotics and ACE inhibitors (Ganapathy, Leibach., Curr. Biol. 3, 695-701, (1991); Nakashima et al., Biochem. Pharm. 33, 3345-3352, (1984); Friedman, Amidon., Pharm. Res., 6, 1043-1047, (1989); Okano et al., J. Biol. Chem., 261, 14130-14134, (1986); Muranushi et al., Pharm. Res., 6, 308-312, (1989); Friedman, Amidon., J. Control. Rel.,  
35       13, 141-146, (1990)).

      PepT1 and PepT2 are proton-driven peptide transporters that



contribute to the absorption of proteins and the maintenance of peptidic nitrogen sources by transporting small-molecule peptides into cells. PepT1 and PepT2 are 12-transmembrane proteins, comprising 708 and 729 amino acids, respectively (J. Biol. Chem., 270(12):6456-6463, (1995); Biochim. Biophys. Acta., 1235:461-466, (1995); and Terada and Inui, Tanpakusitsu Kakusan Kousei, Vol. 46, No. 5, (2001)).

There are reports that PepT1 and PepT2 also transport pharmaceuticals such as  $\beta$ -lactam antibiotics and bestatin (Saito, H. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1631-1637, (1995); Saito, H. et al., Biochim. Biophys. Acta., 1280, 173-177, (1996); and Terada, T. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 281, 1415-1421 (1997)).

PepT1 is mainly expressed in the small intestine, and its expression has also been confirmed in the kidney and pancreas. Expression of PepT2 has been confirmed in the kidney, brain, lung, and spleen. PepT1 and PepT2 have been reported to be localized in the small intestine, and in the brush border membrane of renal tubular epithelial cells (Ogihara, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 220, 848-852, (1996); Takahashi, K. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 286, 1037-1042 (1998); Hong, S. et al., Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 276, F658-F665 (1999); and Terada and Inui, Tanpakusitsu Kakusan Kousei, Vol. 46, No. 5, (2001)).

Furthermore, overexpression of PepT1 in the cell membrane of human pancreatic duct carcinoma cell lines (Cancer Res., 58, 519-525, (1998)), and expression of PepT2 mRNA in human pancreatic duct carcinoma cell lines (Millennium World Congress of Pharmaceutical Sciences, (2000)) have been reported. However, the involvement of PepT1 and PepT2 in cancer cell growth was unclear, and no discussion had been made as to whether inhibiting the function of PepT1 and PepT2 will affect cancer cell proliferation.

#### Disclosure of the Invention

Such circumstances in the art led to the present invention, the objective of which is to provide cell growth inhibitors comprising a peptide transporter inhibitory substance as an active ingredient, and specifically, to provide cell growth inhibitors for cancers such

as pancreatic cancer.

The present inventors found that AT-264 suppresses cell growth through its inhibitory effect on PepT1 activity. Furthermore, as a result of examining whether AT-264 comprises the effect of inhibiting the cell growth of human pancreatic cancer cell line AsPC-1, the present inventors found that it suppressed cell growth in the same way. These findings show that cell growth can be suppressed by inhibiting the activity of peptide transporters. Suppression of peptide transporter activity can be considered as an important indicator for the development of growth inhibitors for cancer cells and such.

More specifically, the present invention provides:

[1] a cell growth inhibitor comprising as an active ingredient a substance that inhibits a peptide transporter;

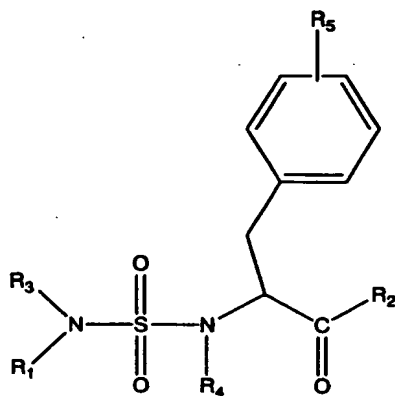
[2] the cell growth inhibitor of [1], wherein the peptide transporter is a proton-driven peptide transporter;

[3] the cell growth inhibitor of [1], wherein the peptide transporter is PepT1 or PepT2;

[4] the cell growth inhibitor of any one of [1] to [3], wherein the peptide transporter inhibitory substance is a substance that inhibits the transport function of a peptide transporter by binding to the peptide transporter;

[5] the cell growth inhibitor of any one of [1] to [3], wherein the peptide transporter inhibitory substance is a sulfamide derivative represented by the following formula (I):

Formula (I)



wherein,

$R_1$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, or amino protecting group;

$R_2$  represents a substituted or unsubstituted, fused or non-fused nitrogen atom-containing heterocycle;

5  $R_3$  represents a  $A-(CH_2)_m-$  group, a hydrogen atom, or a substituted or unsubstituted lower alkyl group, wherein, A represents a substituted or unsubstituted aryl group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocycle, or substituted or unsubstituted lower cycloalkyl group, and m represents an integer from 0 to 6, and the  
10  $-(CH_2)_m-$  may be substituted with one or more substituents;

$R_4$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, or amino protecting group;

$R_5$  represents  $-C(=NR_6)NH_2$ ,  $-NH-C(=NR_6)NH_2$ , or  $-(CH_2)_n-NHR_6$  group, wherein  $R_6$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, hydroxyl  
15 group, acyl group, acyloxy group, lower alkoxy group, lower alkoxy carbonyl group, lower alkoxy carbonyloxy group, or lower hydroxyalkyl carbonyloxy group, n represents an integer from 0 to 2, and the  $-(CH_2)_n-$  may be substituted with one or more substituents;

[6] the cell growth inhibitor of any one of [1] to [5], wherein  
20 the inhibitor suppresses the growth of a cancer cell; and

[7] the cell growth inhibitor of [6], wherein the cancer cell is a pancreatic cancer cell.

The present invention provides cell growth inhibitors  
25 comprising a peptide transporter inhibitory substance as an active ingredient. Peptide transporters targeted by the cell growth inhibitors of this invention are not particularly limited, however are preferably peptide transporters which incorporate peptides into cells using proton motive force. More preferably, they are PepT1 or  
30 PepT2, and most preferably, they are PepT1.

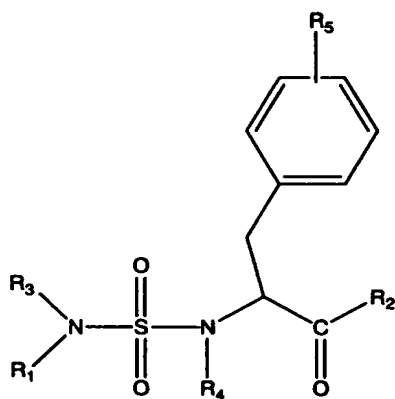
The nucleotide and amino acid sequences of PepT1 and PepT2 are already known (human PepT1: GenBank XM\_007063 (J. Biol. Chem., 270(12):6456-6463, (1995)); and human PepT2: GenBank XM\_002922 (Biochim. Biophys. Acta., 1235:461-466, (1995))).

35 There are no limitations as to the peptide transporter inhibitory substances of the present invention, as long as they

inhibit peptide transporter-mediated transport, and suppress cell growth. Examples of substances that inhibit peptide transporter-mediated transport include substances that inhibit the transport function of a peptide transporter by binding thereto, and substances that suppress peptide transporter expression. Substances that inhibit the transport function of peptide transporters by binding thereto are preferred.

Examples of substances that bind to peptide transporters include synthetic low-molecular-weight compounds, antibodies, proteins, peptides, and natural compounds. The compounds represented by the formula (1) below (see, WO 97/19919) or antibodies are preferred.

Sulfamide derivatives represented by formula (1)



wherein,

$R_1$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, or amino protecting group;

$R_2$  represents a substituted or unsubstituted, fused or non-fused nitrogen-atom-containing heterocycle;

$R_3$  represents a  $A-(CH_2)_m-$  group, hydrogen atom, or substituted or unsubstituted lower alkyl group, wherein, A represents a substituted or unsubstituted aryl group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocycle, or substituted or unsubstituted lower cycloalkyl group, m represents an integer of 0 to 6, and the  $-(CH_2)_m-$  may be substituted with one or more substituents;

$R_4$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, or amino protecting group;

$R_5$  represents  $-C(=NR_6)NH_2$ ,  $-NH-C(=NR_6)NH_2$ , or  $-(CH_2)_n-NHR_6$  group,

wherein  $R_6$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, hydroxyl group, acyl group, acyloxy group, lower alkoxy group, lower alkoxy carbonyl group, lower alkoxy carbonyloxy group, or lower hydroxyalkyl carbonyloxy group,  $n$  represents an integer of 0 to 2, and the  $-(CH_2)_n-$  may be substituted with one or more substituents.

In the present invention, the following terms have the following meanings, unless there are particular limitations.

The lower alkyl group means a linear or branched alkyl group, wherein the number of carbons ranges from one to six, and preferably from one to four. Examples include a methyl group, ethyl group,  $n$ -propyl group,  $i$ -propyl group,  $n$ -butyl group,  $i$ -butyl group,  $s$ -butyl group, and  $t$ -butyl group.

The lower alkoxy group means a linear or branched alkyloxy group, wherein the number of carbons ranges from one to six, preferably ranges from one to four. Examples include a methoxy group, ethoxy group,  $n$ -propoxy group,  $i$ -propoxy group,  $n$ -butoxy group,  $i$ -butoxy group,  $s$ -butoxy group, and  $t$ -butoxy group.

The amino protecting group refers to any group that can protect the amino group to which  $R_1$  is bound in the process of synthesizing a compound of formula (1), and conventionally usable amino protecting groups can be used. Examples of such amino protecting groups include a formyl group, acetyl group, benzoyl group, trifluoroacetyl group, benzyloxycarbonyl group, methoxycarbonyl group,  $t$ -butoxycarbonyl group, phthaloyl group, benzyl group, and tosyl group, and preferably a  $t$ -butoxycarbonyl group.

Furthermore, the substituted or unsubstituted amino group means an amino group that may be substituted with one or more substituents, such as the aforementioned amino protecting group, hydroxyl group, substituted or unsubstituted lower alkyl group, substituted or unsubstituted acyl group including a substituted or unsubstituted lower alkoxy carbonyl group or a substituted or unsubstituted lower alkylaminocarbonyl group, substituted or unsubstituted aryl group, substituted or unsubstituted sulfonyl group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic group, substituted or unsubstituted lower alkoxy group, substituted or unsubstituted cycloalkyl group, substituted or unsubstituted cycloalkyloxy group,

substituted or unsubstituted aryloxy group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic-oxy group, and a substituted or unsubstituted silyl group. Examples include a methylamino group, ethylamino group, acetylamino group, 5 dimethylaminocarbonylamino group, phenylamino group, p-toluenesulfonylamino group, methanesulfonylamino group, 4-piperidinylamino group, cyclohexylamino group, cyclopentylamino group, and cyclopropylamino group, and preferably include a methylamino group, ethylamino group, acetylamino group, 10 p-toluenesulfonylamino group, methanesulfonylamino group, and cyclopropylamino group.

The substituted or unsubstituted lower alkyl group means a lower alkyl group that may be substituted with one or more substituents such as a halogen atom, hydroxyl group, thiol group, substituted or 15 unsubstituted amino group, substituted or unsubstituted acyl group such as a substituted or unsubstituted lower alkoxy carbonyl group or a substituted or unsubstituted lower alkylaminocarbonyl group, nitro group, cyano group, substituted or unsubstituted aryl group, substituted or unsubstituted sulfonyl group, substituted or 20 unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic group, substituted or unsubstituted carboxyl group, substituted or unsubstituted lower alkoxy group, substituted or unsubstituted cycloalkyl group, substituted or unsubstituted cycloalkyloxy group, substituted or unsubstituted aryloxy group, substituted or unsubstituted lower 25 alkylthio group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic-oxy group, substituted or unsubstituted cycloalkylthio group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic-thio group, substituted or unsubstituted arylthio group, substituted or unsubstituted sulfonyloxy group, and substituted or 30 unsubstituted silyl group. Examples include a 2-(pyrrolidine-1-ylcarbonyl)ethyl group, 3-phenyl-2-(pyrrolidine-1-ylcarbonyl)-n-propyl group, 3,3-diphenyl-n-propyl group, 2,2-diphenylethyl group, and 2-cyclohexyloxyethyl group, and preferably include a 35 3-phenyl-2-(pyrrolidine-1-ylcarbonyl)-n-propyl group, 3,3-diphenyl-n-propyl group, and 2,2-diphenylethyl group.

The substituted or unsubstituted lower alkoxy group means a lower alkoxy group substituted with substituents similar to those described for the above-mentioned lower alkyl groups. Examples include a fluoromethoxy group, fluoroethoxy group, and benzyloxy group.

The aryl group is a group in which one hydrogen atom is removed from an aromatic hydrocarbon. Examples include a phenyl group, tolyl group, naphthyl group, xylyl group, biphenyl group, anthryl group and phenanthryl group, and preferably include a phenyl group and naphthyl group.

The substituted or unsubstituted aryl group means the abovementioned aryl group in which an arbitrary hydrogen atom may be substituted with one or more substituents, including a substituted or unsubstituted lower alkyl group, substituted or unsubstituted lower alkoxy group, halogen atom, hydroxyl group, thiol group, substituted or unsubstituted amino group, substituted or unsubstituted acyl group, substituted or unsubstituted lower alkylthio group, nitro group, cyano group, substituted or unsubstituted aryl group, substituted or unsubstituted arylalkyl group, substituted or unsubstituted aryloxy group, substituted or unsubstituted sulfonyl group, substituted or unsubstituted carboxyl group, substituted or unsubstituted lower alkylsulfonyl group, substituted or unsubstituted lower alkylsulfonylamino group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic group, substituted or unsubstituted cycloalkylthio group, substituted or unsubstituted sulfonyloxy group, substituted or unsubstituted arylthio group, substituted or unsubstituted silyl group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic-oxy group, and a substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic-thio group. Examples include an o-methylphenyl group, m-hydroxyphenyl group, p-carboxylphenyl group, 2-phenethylphenyl group, 2,3-dimethoxyphenyl group, 2-methyl-4-aminophenyl group, phenoxyphenyl group, 3-phenethylphenyl group, 5-cyanonaphthyl group, 4-amino-1-naphthyl group, 6-hydroxy-1-naphthyl group, 3-methoxyphenyl group, 2-methoxyphenyl group, 2-ethoxyphenyl group, 2-benzylphenyl group, 3-bromo-1-naphthyl group,

6-methoxy-1-naphthyl group, 1-naphthyl group, and 2-naphthyl group, and preferably include a 2-phenethylphenyl group, 6-hydroxy-1-naphthyl group, 3-bromo-1-naphthyl group, and 2,3-dimethoxyphenyl group. A substituted or unsubstituted  
5 cycloalkyl group means a cycloalkyl group with three to seven carbons, preferably four to six carbons, of which an arbitrary hydrogen atom may be substituted with one or more substituents, such as groups similar to those of the aforementioned aryl group. Examples include a cyclopropyl group, cyclobutyl group, cyclopentyl group, cyclohexyl  
10 group, 1-fluorocyclopropyl group, 2-benzylcyclohexyl group, 2-aminocyclopentyl group, 2-carboxycyclopentyl group, and 2-(6-methoxy-1,4-benzoquinone), and preferably a cyclohexyl group.

The substituted or unsubstituted, fused or non-fused nitrogen atom-containing heterocycle means a saturated or unsaturated three-  
15 to seven-membered heterocycle which contains one or more nitrogen atoms as a heteroatom, and which may further contain heteroatoms such as oxygen atoms and sulfur atoms. The nitrogen atom-containing heterocycle may be fused to one or more three- to seven-membered aromatic rings, heterocycles, or cycloalkyl rings. An arbitrary  
20 hydrogen atom bound to a ring carbon atom may be substituted with one or more substituents, such as those similar to the substituents of the aforementioned aryl group. Examples of a nitrogen atom-containing heterocycle include an aziridine ring, azetidine ring, pyrrole ring, pyrroline ring, pyrrolidine ring, indole ring, indoline  
25 ring, isoindole ring, octahydroindole ring, carbazole ring, pyridine ring, piperidine ring, quinoline ring, dihydroquinoline ring, tetrahydroquinoline ring, decahydroquinoline ring, isoquinoline ring, tetrahydroisoquinoline ring, decahydroisoquinoline ring, quinolone ring, acridine ring, phenanthridine ring, benzoquinoline  
30 ring, pyrazole ring, imidazole ring, imidazoline ring, imidazolidine ring, benzoimidazole ring, pyridazine ring, pyrimidine ring, pyrazine ring, piperazine ring, benzodiazine ring, triazole ring, benzotriazole ring, triazine ring, tetrazole ring, tetrazine ring, purine ring, xanthine ring, theophylline ring, guanine ring,  
35 pteridine ring, naphthylidine ring, quinolizine ring, quinuclidine ring, indolizine ring, oxazole ring, benzoxazole ring, isoxazole ring,



oxazine ring, phenoxazine ring, thiazole ring, thiazolidine ring, benzothiazole ring, isothiazole ring, thiazine ring, oxadiazole ring, oxadiazine ring, thiadiazole ring, thiadiazine ring, dithiazine ring, and morpholine ring, and preferably include a piperidine ring, piperazine ring, isoquinoline ring, and tetrahydroisoquinoline ring. Preferred examples of those having substituents include an N-acetylpiperazine ring, N-p-toluenesulfonylpiperazine ring, and 4-methylpiperidine ring.

The substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocycle means a saturated or unsaturated three- to seven-membered heterocycle containing one or more nitrogen atoms, oxygen atoms, or sulfur atoms as a heteroatom. The heterocycle may be fused to one or more three- to seven-membered aromatic rings, heterocycles, and cycloalkyl rings. An arbitrary hydrogen atom bound to a ring carbon atom may be substituted with one or more substituents such as those similar to the substituents of the aforementioned aryl group. Besides the aforementioned nitrogen atom-containing heterocycle, examples of such a heterocycle include a pyran ring, furan ring, tetrahydropyran ring, tetrahydrofuran ring, thiophene ring, benzothiophene ring, dihydrobenzothiophene ring, benzofuran ring, isobenzofuran ring, chroman ring, chromene ring, dibenzofuran ring, isochroman ring, phenoxatine ring, xanthine ring, thianthrene ring, benzodioxane ring, benzodioxolane ring, and thiolane ring, and preferably a benzothiophene ring.

The acyl group is a group in which the OH in the carboxyl group of a carboxylic acid has been removed. Examples include a formyl group, acetyl group, propionyl group, butyryl group, valeryl group, oxalyl group, malonyl group, succinyl group, benzoyl group, toluoyl group, naphthoyl group, phthaloyl group, pyrrolidinecarbonyl group, and pyridinecarbonyl group, and preferably include an acetyl group and benzoyl group. Furthermore, the substituted or unsubstituted acyl group means an acyl group substituted with a lower alkyl group, or another group similar to those shown for the aforementioned lower alkyl group, as a substituent. Examples include a substituted or unsubstituted lower alkylcarbonyl group, substituted or unsubstituted lower alkylaminocarbonyl group, substituted or

unsubstituted lower alkyloxy carbonyl group, and aminocarbonyl carbonyl group.

The acyloxy group means an acyl group to which an oxygen atom is bound, and examples include an acetoxyl group and benzoyloxy group.

5 The lower alkoxy carbonyl group means a lower alkoxy group to which a carbonyl group is bound, in which the number of carbons in the alkoxy portion ranges from one to six, and preferably ranges from one to four. Examples include a methoxycarbonyl group, ethoxycarbonyl group, n-propoxycarbonyl group, i-propoxycarbonyl group, n-butoxycarbonyl group, i-butoxycarbonyl group, s-butoxycarbonyl group, and t-butoxycarbonyl group, and preferably include a methoxycarbonyl group and ethoxycarbonyl group.

15 The lower alkoxy carbonyloxy group means a lower alkoxy carbonyl group to which an oxygen atom is bound, in which the number of carbons in the alkoxy portion ranges from one to six, and preferably ranges from one to four. Examples include a methoxycarbonyloxy group, ethoxycarboxyloxy group, n-propoxycarbonyloxy group, i-propoxycarbonyloxy group, n-butoxycarbonyloxy group, i-butoxycarbonyloxy group, s-butoxycarbonyloxy group, and t-butoxycarbonyloxy group, and preferably include a methoxycarbonyloxy group and ethoxycarbonyloxy group. Hydroxyalkyl carbonyloxy group refers to the aforementioned lower alkyl group substituted with one or more hydroxyl groups to which a carbonyloxy group (COO) is bound. Examples include a hydroxymethyl carbonyloxy group, 2-hydroxyethyl carbonyloxy group, and 2,3-dihydroxypropyl carbonyloxy group, in which the number of carbons in the alkyl portion ranges from one to six, and preferably ranges from one to four.

25 Examples of the halogen atom include a fluorine atom, chlorine atom, bromine atom, and iodine atom.

30 The lower alkyl sulfonyl group is the aforementioned lower alkyl group to which a sulfonyl group is bound, in which the number of carbons ranges from one to six, and preferably ranges from one to four. Examples include a methyl sulfonyl group, ethyl sulfonyl group, n-propyl sulfonyl group, and i-propyl sulfonyl group.

35 Furthermore, an aryl sulfonyl group means the aforementioned

aryl group to which a sulfonyl group is bound, and preferably includes a phenylsulfonyl group and a naphthylsulfonyl group.

5 The substituted or unsubstituted lower alkylsulfonyl group and the substituted or unsubstituted arylsulfonyl group represent the aforementioned lower alkylsulfonyl group and arylsulfonyl group in which an arbitrary hydrogen atom bound to a carbon atom thereof may be substituted with one or more substituents. Examples of the substituents include those similar to the substituents indicated for the aforementioned aryl group. Such examples include a  
10 p-toluenesulfonyl group and a trifluoromethanesulfonyl group.

The substituted or unsubstituted aminosulfonyl group is the aforementioned substituted or unsubstituted amino group to which a sulfonyl group is bound. Examples include a methylaminosulfonyl group and a benzylaminosulfonyl group.

15 The substituted or unsubstituted lower alkoxy sulfonyl group means the aforementioned substituted or unsubstituted lower alkoxy group to which a sulfonyl group is bound, and preferably includes methoxy sulfonyl group and benzyloxy sulfonyl group. The substituted or unsubstituted cycloalkoxy sulfonyl group means a substituted or  
20 unsubstituted cycloalkyl group to which a sulfonyl group is bound through an oxygen atom. Examples include a cyclohexyloxy sulfonyl group and cyclopentyloxy sulfonyl group.

The substituted or unsubstituted cycloalkylsulfonyl group is the aforementioned substituted or unsubstituted cycloalkyl group to  
25 which a sulfonyl group is bound. Examples include a cyclohexylsulfonyl group and cyclopentylsulfonyl group.

The substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic sulfonyl group means a substituted or unsubstituted heterocyclic group to which a sulfonyl group is bound, and preferably  
30 includes a 4-quinoly sulfonyl group and 8-tetrahydroquinoly sulfonyl group.

Furthermore, the substituted or unsubstituted sulfonyl group refers to a substituted or unsubstituted lower alkylsulfonyl group, substituted or unsubstituted cycloalkylsulfonyl group, substituted  
35 or unsubstituted cycloalkoxy sulfonyl group, substituted or unsubstituted aminosulfonyl group, substituted or unsubstituted,

fused or non-fused heterocyclic sulfonyl group, substituted or unsubstituted lower alkoxy sulfonyl group, or substituted or unsubstituted aryl sulfonyl group.

5 The substituted or unsubstituted carboxyl group means the aforementioned substituted or unsubstituted acyl group to which an oxy group is bound. Examples include a methylcarbonyloxy group, ethylcarbonyloxy group, isopropylcarbonyloxy group, phenylcarbonyloxy group, and cyclohexylcarbonyloxy group.

10 The lower alkoxyalkyl group means the aforementioned lower alkoxy group to which a lower alkyl group is bound. Examples include a methoxymethyl group, methoxyethyl group, t-butoxymethyl group, 1-ethoxyethyl group, and 1-(isopropoxy)ethyl group. Furthermore, the alkoxy group or alkyl group portions of the lower alkoxyalkyl group may be substituted with groups similar to the substituents  
15 indicated for the aforementioned alkyl group.

The lower hydroxyalkyl group means the aforementioned lower alkyl group which is substituted with one or more hydroxyl groups. Examples include a hydroxymethyl group, 2-hydroxyethyl group, 1-hydroxyethyl group, 3-hydroxy-n-propyl group, and  
20 2,3-dihydroxy-n-butyl group. Furthermore, the alkyl group portion of the lower hydroxyalkyl group may be substituted with groups similar to the substituents indicated for the aforementioned alkyl group.

The lower aminoalkyl group means the aforementioned substituted or unsubstituted amino group to which the aforementioned lower alkyl group is bound. Examples include a t-butylaminomethyl group, aminomethyl group, 2-aminoethyl group, benzylaminomethyl group, methylaminomethyl group, and 2-methylaminoethyl group. Furthermore,  
25 the alkyl group portion of the lower aminoalkyl group may be substituted with groups similar to the substituents indicated for the aforementioned alkyl group.  
30

The lower carboxylalkyl group is the aforementioned substituted or unsubstituted carboxyl group to which the aforementioned lower alkyl group is bound. Examples include an acetyloxymethyl group, 2-acetyloxyethyl group, ethylcarbonyloxymethyl group, cyclohexylcarbonyloxymethyl group, cyclopropylcarbonyloxymethyl group, and isopropylcarbonyloxymethyl group. Furthermore, the alkyl  
35

group portion of the lower carboxylalkyl group may be substituted with groups similar to the substituents indicated for the aforementioned alkyl group.

5 The lower carbonylaminoalkyl group means the aforementioned substituted or unsubstituted acyl group to which the aforementioned lower aminoalkyl group is bound. Examples include an acetylaminomethyl group, t-butyloxycarbonylaminomethyl group, ethylcarbonylaminomethyl group, acetylaminoethyl group, and benzyloxycarbonylaminoethyl group. Furthermore, the amino group or  
10 alkyl group portion of the lower carbonylamino alkyl group may be substituted with groups similar to the substituents indicated for the aforementioned alkyl group.

The substituted or unsubstituted lower alkylthio group is the aforementioned substituted or unsubstituted lower alkyl group to  
15 which a thio group is bound. Examples include a methylthio group, ethylthio group, isopropylthio group, and t-butylthio group.

The substituted or unsubstituted cycloalkylthio group means the aforementioned substituted or unsubstituted cycloalkyl group to which a thio group is bound. Examples include a cyclopropylthio group, cyclobutylthio group, cyclopentylthio group, and cyclohexylthio  
20 group.

The substituted or unsubstituted arylthio group is the aforementioned substituted or unsubstituted aryl group to which a thio group is bound. Examples include a phenylthio group, 1-naphthylthio group, and 2-naphthylthio group.  
25

The substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic thio group means the aforementioned substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic group to which a thio group is bound. Examples include a 4-quinolylthio group and  
30 8-tetrahydroquinolylthio group.

The substituted or unsubstituted sulfonyloxy group is the aforementioned substituted or unsubstituted sulfonyl group to which an oxy group is bound. Examples include a p-toluenesulfonyloxy group and a methanesulfonyloxy group.

35 The substituted or unsubstituted cycloalkyloxy group is the aforementioned substituted or unsubstituted cycloalkyl group to which

an oxy group is bound. Examples include a cyclopropyloxy group, cyclobentyloxy group, and 4-aminocyclohexyloxy group.

5 The substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic-oxy group means the aforementioned substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocyclic group to which an oxy group is bound. Examples include a 4-quinolyloxy group and an 8-tetrahydroquinolyloxy group.

10 The substituted or unsubstituted silyl group refers to a silyl group to which one to three of the same or different aforementioned substituted or unsubstituted lower alkyl group or substituted or unsubstituted aryl group are bound. Examples include a trimethylsilyl group, triethylsilyl group, t-butyldimethylsilyl group, t-butyldiphenylsilyl group, and triisopropylsilyl group.

15 Furthermore, substituents that may be substituted in the  $-(CH_2)_m-$  portion and  $-(CH_2)_n-$  portion include substituents similar to those described as substituents of the aforementioned aryl group.

20 There are no particular limitations on the antibodies used as the active ingredient of the cell growth inhibitors of the present invention, as long as they bind to the antigen. Mouse antibodies, rat antibodies, rabbit antibodies, sheep antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, and human antibodies may be used appropriately. Although the antibodies may be either polyclonal or monoclonal antibodies, monoclonal antibodies are preferred from the point of view that they can stably produce homogeneous antibodies.

25 Polyclonal and monoclonal antibodies can be prepared by methods well known to those skilled in the art.

Hybridoma cells that produce monoclonal antibodies can basically be produced using conventional techniques, described as follows: Specifically, the hybridoma cells can be prepared by (1)

30 conducting immunization using the desired antigen, or cells expressing the desired antigen, as the sensitizing antigen according to normal immunization methods; (2) fusing the obtained immunized cells with conventional parent cells by normal cell fusion methods; and (3) screening for monoclonal antibody-producing cells

35 (hybridomas) using normal screening methods. Antigens can be prepared according to conventional methods such as methods using

baculoviruses (e.g. WO 98/46777). Hybridomas can be produced, for example, according to the method of Milstein et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46). When the antigen has low immunogenicity, immunization can be performed by linking it to a macromolecule with immunogenicity, such as albumin.

Recombinant antibodies can also be used, and can be produced by (1) cloning an antibody gene from a hybridoma; (2) incorporating the antibody gene into an appropriate vector; (3) introducing the vector into a host; and (4) producing the recombinant antibodies by genetic engineering techniques (see, for example, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Specifically, cDNAs of the variable regions (V regions) of antibodies are synthesized from hybridoma mRNAs using reverse transcriptase. When DNAs encoding a V region of an antibody of interest are obtained, they are linked to DNAs encoding an antibody constant region (C region) of interest, and are then incorporated into expression vectors. Alternatively, DNAs encoding an antibody V region can be incorporated into expression vectors comprising DNAs of an antibody C region. The DNAs are incorporated into expression vectors such that expression is controlled by expression regulatory regions such as enhancers and promoters. Host cells are then transformed with these expression vectors to express the antibodies.

In the present invention, recombinant antibodies artificially modified to reduce heterologous antigenicity against humans can be used. Examples of such include chimeric antibodies and humanized antibodies. These modified antibodies can be produced using known methods. A chimeric antibody is an antibody comprising the antibody heavy chain and light chain variable regions of a nonhuman mammal such as a mouse, and the antibody heavy chain and light chain constant regions of a human. A chimeric antibody can be obtained by (1) ligating the DNA encoding a variable region of a mouse antibody to the DNA encoding a constant region of a human antibody; (2) incorporating them into an expression vector; and (3) introducing the vector into a host for production of the antibody.

A humanized antibody, which is also called a reshaped human

antibody, is obtained by transplanting a complementarity determining region (CDR) of an antibody of a nonhuman mammal such as a mouse, into the CDR of a human antibody. Conventional genetic recombination techniques for the preparation of such antibodies are known.

5 Specifically, a DNA sequence designed to ligate a CDR of a mouse antibody with the framework regions (FRs) of a human antibody is synthesized by PCR, using several oligonucleotides constructed to comprise overlapping portions at their ends. A humanized antibody can be obtained by (1) ligating the resulting DNA to a DNA which encodes  
10 a human antibody constant region; (2) incorporating this into an expression vector; and (3) transfecting the vector into a host to produce the antibody (see, European Patent Application No. EP 239,400, and International Patent Application No. WO 96/02576). Human antibody FRs that are ligated via the CDR are selected where the CDR  
15 forms a favorable antigen-binding site. As necessary, amino acids in the framework region of an antibody variable region may be substituted such that the CDR of a reshaped human antibody forms an appropriate antigen-binding site (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

20 Methods for obtaining human antibodies are also known. For example, desired human antibodies with antigen-binding activity can be obtained by (1) sensitizing human lymphocytes with antigens of interest or cells expressing antigens of interest *in vitro*; and (2) fusing the sensitized lymphocytes with human myeloma cells such as  
25 U266 (see Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Hei 1-59878). Alternatively, the desired human antibody can also be obtained by using the desired antigen to immunize a transgenic animal that comprises the entire repertoire of human antibody genes (see International Patent Application WO 93/12227, WO 92/03918, WO  
30 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, and WO 96/33735). Furthermore, techniques to obtain human antibodies by panning with a human antibody library are known. For example, the variable region of a human antibody is expressed as a single chain antibody (scFv) on the surface of a phage using phage display method, and phages that bind to the  
35 antigen can be selected. By analyzing the genes of selected phages, the DNA sequences encoding the variable regions of human antibodies



that bind to the antigen can be determined. If the DNA sequences of scFvs that bind to the antigen are identified, appropriate expression vectors containing these sequences can be constructed, and human antibodies can be obtained. Such methods are already well known (see  
5 WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, and WO 95/15388).

When the antibody genes have been isolated and introduced into an appropriate host, hosts and expression vectors can be used in appropriate combination to produce the antibodies. As eukaryotic  
10 host cells, animal cells, plant cells, and fungal cells may be used. Known animal cells include (1) mammalian cells such as CHO, COS, myeloma, baby hamster kidney (BHK), HeLa, and Vero cells; (2) amphibian cells such as *Xenopus* oocytes; or (3) insect cells such as sf9, sf21, and Tn5. Known plant cells include cells derived from  
15 the *Nicotiana* genus such as *Nicotiana tabacum*, which can be callus cultured. Known fungal cells include yeasts such as the *Saccharomyces* genus, for example *Saccharomyces cerevisiae*, and filamentous fungi such as the *Aspergillus* genus, for example *Aspergillus niger*. Prokaryotic cells can also be used in production  
20 systems that utilize bacterial cells. Known bacterial cells include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. By transferring the antibody genes of interest into these cells using transformation, and then culturing the transformed cells *in vitro*, the antibodies can be obtained.

Furthermore, the antibody may be an antibody fragment or a  
25 modified antibody thereof, as long as it binds to PepT and inhibits its function. For example, the antibody fragment may be Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, or single chain Fv (scFv) in which Fv from H or L chains are ligated by an appropriate linker. More specifically, the antibody fragment is obtained by (1) treating the antibody with enzymes such as papain  
30 and pepsin; (2) transferring it into an expression vector; and then (3) expressing it in an appropriate host cell (see, for example, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496,  
35 Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669; and Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137). scFv

can be obtained by ligating the V regions of the antibody H-chain and L-chain. In the scFv, the V regions of the H chain and L chain are ligated via a linker, and preferably via a peptide linker (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (1988) 85, 5879-5883).

5 The V regions of the scFv H chain and L chain may be derived from any of the antibodies described herein. The peptide linker used to ligate the V regions may be, for example, any single-chain peptide consisting of 12 to 19 residues. DNA encoding scFv can be amplified by PCR using as a template either the whole DNA, or a partial DNA  
10 encoding a desired DNA, selected from a DNA encoding the H chain or the V region of the H chain of the above antibody, and a DNA encoding the L chain or the V region of the L chain of the above antibody; and using a primer pair that defines the two ends. Further amplification can be subsequently conducted using the combination  
15 of DNA encoding the peptide linker portion, and the primer pair that defines both ends of the DNA to be ligated to the H chain and the L chain respectively. Once DNAs encoding scFvs are constructed, expression vectors containing the DNAs, and hosts transformed by these expression vectors, can be obtained according to conventional methods.  
20 Furthermore, scFvs can be obtained according to conventional methods using the resulting hosts. These antibody fragments can be produced in hosts by obtaining genes encoding the antibody fragments and expressing them in a manner similar to that outlined above. Antibodies bound to various types of molecules, such as  
25 polyethyleneglycol (PEG), may be used as modified antibodies. Such modified antibodies can be obtained by chemical modifications of the resulting antibodies. Methods for modifying antibodies are already established in the art. The term "antibody" in the present invention also encompasses the above-described antibodies.

30 Antibodies expressed and produced as described above can be purified by conventional methods for purifying normal proteins. Antibodies can be separated and purified by, for example, appropriately selecting and/or combining affinity columns such as a protein A column, or a chromatography column, filtration,  
35 ultrafiltration, salt precipitation, dialysis, and such (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor

Laboratory, 1988).

Conventional means can be used to measure the antigen-binding activity of the antibodies (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). For example, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), or fluoroimmunoassay may be used.

Whether a particular molecule binds to a peptide transporter can be determined using conventional methods. Examples of conventional methods include immunoprecipitation, West-Western blotting, ELISA, EIA, RIA, fluoroimmunoassay, and methods using a biosensor utilizing surface plasmon resonance effect.

Candidate compounds for the cell growth inhibitors of the present invention can be screened using the activity of binding to this kind of peptide transporter as an indicator. Specifically, a test sample is contacted with a peptide transporter, binding between the peptide transporter and the test sample is detected, and compounds that bind to the peptide transporter can be selected. There are no particular limitations as to the test samples. Examples include cell extracts, cell culture supernatants, products of fermenting microorganisms, extracts from marine organisms, plant extracts, purified or crude purified proteins (including antibodies), peptides, non-peptidic compounds, synthetic low-molecular-weight compounds, and natural compounds. The peptide transporter can be contacted with the test sample, for example, as a purified protein, in a form bound to a carrier, as a fusion protein with another protein, in a form expressed on a cell membrane, or as a membrane fraction. When selecting strong candidates for the cell growth inhibitors of this invention from compounds that bind to a peptide transporter obtained in this manner, it is useful to determine whether these compounds inhibit the transport function of the peptide transporter. Whether a particular molecule inhibits the transport function of a peptide transporter can be judged by conventional methods, for example by labeling a substrate such as a peptide with a radioactive substance (e.g.  $^{14}\text{C}$ ), or a fluorescent substance, and then measuring the amount of the substrate incorporated into peptide transporter-expressing cells.

Substances that suppress the expression of peptide transporters can be used as active ingredients for the cell growth inhibitors of this invention. Examples of such substances include antisense oligonucleotides against peptide transporter genes. Examples of  
5 antisense oligonucleotides include an antisense oligonucleotide that hybridizes to any site of the DNA or mRNA encoding a peptide transporter. Preferably, the antisense oligonucleotide is against at least 15 or more continuous nucleotides in the DNA or mRNA of a peptide transporter. More preferably, the antisense oligonucleotide  
10 is against at least 15 or more continuous nucleotides comprising a translation initiation codon. Derivatives and modified forms of these can also be used as antisense oligonucleotides, including modified lower alkylphosphonates such as methyl phosphonate forms and ethyl phosphonate forms, modified phosphorothioate, or modified  
15 phosphoroamidate.

There are no particular limitations as to the cells to be targeted by the cell growth inhibitors of the present invention, but cancer cells such as pancreatic cancer cells, liver cancer cells, lung cancer cells, esophageal cancer cells, breast cancer cells, and  
20 colon cancer cells are preferred, and pancreatic cancer cells are especially preferred. The cell growth inhibitors of the present invention are used for the purpose of treatment and prevention of diseases caused by cell growth, and more specifically of cancers such as pancreatic cancer.

25 The cell growth inhibitors of the present invention can be administered either orally or parenterally, but are preferably administered parenterally. Specific examples include injections, nasal formulations, pulmonary formulations, and cutaneous formulations. For example, injections can be administered  
30 systemically or locally by intravenous injection, intramuscular injection, intraperitoneal injection, or subcutaneous injection. Furthermore, the method of administration can be selected appropriately according to the age and symptoms of the patient. A single dose can be selected, for example, from within the range of  
35 0.0001 mg to 1,000 mg per kg body weight. Alternatively, the dose can be selected, for example, from within the range of 0.001 to 100,000

mg/body for each patient. However, the dose of a therapeutic agent of the present invention is not limited to these examples. Furthermore, the therapeutic agents of the present invention can be formulated according to standard methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A), and may comprise pharmaceutically acceptable carriers and additives.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the PepT1 inhibiting ability of AT-264 in Caco-2 cells.

Fig. 2 shows the cell growth inhibitory effect of AT-264 against human pancreatic cancer cell line AsPC-1. The data are shown as an average  $\pm$  S.D. (n=3 to 4).

Fig. 3 shows the PepT2 inhibiting ability of AT-264 in BaF3/PepT2. The data are shown as an average  $\pm$  S.D. (n=3 to 4).

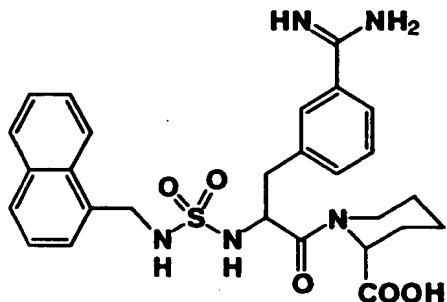
Fig. 4 shows the cell growth inhibitory effect of AT-264 against human pancreatic cancer cell line BxPC-3. The data are shown as an average  $\pm$  S.D. (n=6).

#### Best Mode for Carrying out the Invention

Hereinafter, the present invention is specifically illustrated with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

##### [Example 1] Inhibitory effect of AT-264 on PepT1 activity

The structure of AT-264 is represented by the structural formula below. The following experiments confirmed that this compound is an inhibitor of peptide transporters (PepTs).



AT-264's ability to inhibit PepT was examined using a human colon cancer cell line (Caco-2 cells). The results were that the  $IC_{50}$  for uptake of radioactive substrate [ $^{14}C$ ] glycylsarcosine into cells was 100  $\mu M$  (Fig. 1). In Caco-2 cells, only PepT1 was expressed, and PepT1 function was considered to be inhibited by AT-264. The purity of AT-264 used in the present experiment was approximately 50% to 60%, and the actual  $IC_{50}$  was thought to be about 50  $\mu M$  or so.

[Example 2] The cell growth inhibitory effect of AT-264 against human pancreatic cancer cell line AsPC-1

AT-264 was dissolved in RPMI1640 - 10 mM Hepes (hereinafter, abbreviated to 'the medium') containing 0.5% ethanol and 0.5% DMSO to prepare 2.5 mM AT-264 solution. Then, this solution was diluted with the medium to prepare 0.625 mM and 0.0625 mM AT-264 solutions.

A  $5 \times 10^4$  cells/mL solution of human pancreatic cancer cell line AsPC-1 was prepared using a medium containing 50% FBS. This suspension was plated onto a 96-well plate pre-coated with Collagen type I at 40  $\mu L$ /well ( $2 \times 10^3$  cells), and 160  $\mu L$  of the AT-264 solution was added. This was cultured for six days in a  $CO_2$  incubator (on the second day of culturing, 100 units/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin were added). On the sixth day of culturing, the number of viable cells was quantified by MTS assay.

The results of the cell growth experiment are shown in Fig. 2. Cell growth inhibition was confirmed to be approximately 30% in the presence of 2 mM AT-264, and was present even in the presence of 0.5 mM AT-264, although slight. Morphological changes to AsPC-1 were not observed under the microscope, even in the presence of AT-264. Furthermore, the results of RT-PCR indicated that in AsPC-1, PepT1 expression was greater than PepT2. Accordingly, cell growth inhibition by AT-264 was considered to be due to the inhibition of PepT1 function, and not to non-specific cytotoxicity.

[Example 3] Inhibitory effect of AT-264 on PepT2 activity

The ability of AT-264 to inhibit PepT2 was examined using a murine bone marrow-derived cell line BaF3 in which human PepT2 is forced to be expressed (hereinafter, abbreviated to BaF3/PepT2). As

a result, the uptake of radioactive substrate [ $^3\text{H}$ ] glycylsarcosine into cells was inhibited in a concentration-dependent manner (Fig. 3). Accordingly, AT-264 was found to inhibit the function of not only PepT1, but also of PepT2.

5

[Example 4] Cell growth inhibitory effect of AT-264 on human pancreatic cancer cell line BxPC-3

AT-264 was dissolved in RPMI1640 - 10 mM Hepes with 100 units/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (hereinafter, abbreviated to 'the medium') containing 0.5% ethanol and 0.5% DMSO to prepare 2.5 mM AT-264 solution. Furthermore, this solution was diluted with the medium to prepare 0.625 mM and 0.0625 mM AT-264 solutions.

$5 \times 10^4$  cells/mL solution of BxPC-3 was prepared using the medium containing 50% FBS. This suspension was plated onto a 96-well plate pre-coated with Collagen type I at 40  $\mu\text{L}$ /well ( $2 \times 10^3$  cells), and 160  $\mu\text{L}$  of AT-264 solution was added. This was cultured for six days in a  $\text{CO}_2$  incubator, and on the sixth day of culturing, the number of viable cells was quantified by MTS assay.

The results of the cell growth experiment are shown in Fig. 4. Cell growth inhibition was confirmed to be approximately 75% in the presence of 2 mM AT-264, and approximately 20% even in the presence of 0.5 mM AT-264. Morphological changes to BxPC-3 were not observed under the microscope, even in the presence of AT-264. Furthermore, the RT-PCR results showed that PepT2 expression was greater than PepT1 expression in BxPC-3. Accordingly, cell growth inhibition by AT-264 was considered to be due to the inhibition of PepT2 function, and not due to cytotoxicity.

#### Industrial Applicability

The present invention revealed that cell growth can be suppressed by inhibiting the activity of peptide transporters. Accordingly, cell growth inhibitors can be developed using peptide transporters as targets. Such cell growth inhibitors are highly expected to be of use in suppressing the growth of cancers (for example, pancreatic cancer).

## CLAIMS

1. A cell growth inhibitor comprising as an active ingredient a substance that inhibits a peptide transporter.

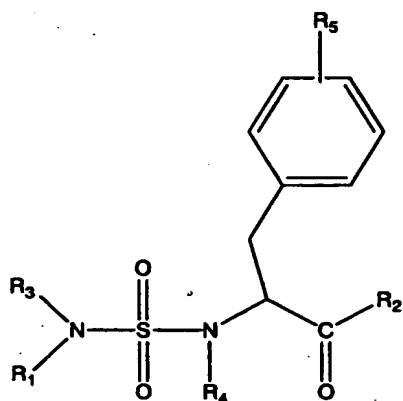
5 2. The cell growth inhibitor of claim 1, wherein the peptide transporter is a proton-driven peptide transporter.

10 3. The cell growth inhibitor of claim 1, wherein the peptide transporter is PepT1 or PepT2.

15 4. The cell growth inhibitor of any one of claims 1 to 3, wherein the peptide transporter inhibitory substance is a substance that inhibits the transport function of a peptide transporter by binding to the peptide transporter.

5. The cell growth inhibitor of any one of claims 1 to 3, wherein the peptide transporter inhibitory substance is a sulfamide derivative represented by the following formula (I):

20 Formula (I)



wherein,

R<sub>1</sub> represents a hydrogen atom, lower alkyl group, or amino protecting group;

25 R<sub>2</sub> represents a substituted or unsubstituted, fused or non-fused nitrogen atom-containing heterocycle;

R<sub>3</sub> represents a A-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- group, a hydrogen atom, or a substituted or unsubstituted lower alkyl group, wherein, A represents a



substituted or unsubstituted aryl group, substituted or unsubstituted, fused or non-fused heterocycle, or substituted or unsubstituted lower cycloalkyl group, and m represents an integer from 0 to 6, and the  $-(CH_2)_m-$  may be substituted with one or more substituents;

5  $R_4$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, or amino protecting group;

$R_5$  represents  $-C(=NR_6)NH_2$ ,  $-NH-C(=NR_6)NH_2$ , or  $-(CH_2)_n-NHR_6$  group, wherein  $R_6$  represents a hydrogen atom, lower alkyl group, hydroxyl group, acyl group, acyloxy group, lower alkoxy group, lower  
10 alkoxy carbonyl group, lower alkoxy carbonyloxy group, or lower hydroxyalkyl carbonyloxy group, n represents an integer from 0 to 2, and the  $-(CH_2)_n-$  may be substituted with one or more substituents.

6. The cell growth inhibitor of any one of claims 1 to 5, wherein  
15 the inhibitor suppresses the growth of a cancer cell.

7. The cell growth inhibitor of claim 6, wherein the cancer cell is a pancreatic cancer cell.

## ABSTRACT

The present invention revealed that AT-264 suppresses cell growth through its inhibitory effect on PepT1 activity. Furthermore, as a result of examining whether AT-264 comprises the effect of inhibiting the cell growth of human pancreatic cancer cell line AsPC-1, the present invention revealed that cell growth is similarly suppressed. These findings show that cell growth can be suppressed by inhibiting the activity of peptide transporters. Suppression of peptide transporter activity can be considered to be an important indicator in the development of growth inhibitors for cancer cells and such.

